



TITLE:

大腸菌F因子の複製におけるdna
A遺伝子の関与に関する分子遺伝学
的研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

村上, 洋太

CITATION:

村上, 洋太. 大腸菌F因子の複製におけるdna A遺伝子の関与に関する分子遺伝学的研究. 京都大学, 1987, 理学博士

ISSUE DATE:

1987-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k3695>

RIGHT:

新 制
理
565
京大附図

学位申請論文

生物物理学専攻 村上洋太

新 制
理
565

学 位 審 査 報 告

京大附図

氏 名	村 上 洋 太
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 年 月 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
(学 位 論 文 題 目) <div style="text-align: center;"> 因子 大腸菌 F の複製における <i>dnaA</i> 遺伝子の関与に関する 分子遺伝学的研究 </div>	
論 文 調 査 委 員	主 査 由 良 隆 高 浪 満, 今 井 六 雄

理 学 研 究 科

(論文内容の要旨)

本研究は、DNA 自己複製の開始機構解明の手がかりを得る目的で行われた。RNA 分解酵素の 1 つ RNase H をコードする遺伝子 (*rnh*) に変異を起した大腸菌変異体を用いた解析の過程で予期しなかった現象を発見した。すなわち従来より、*oriC* を起点とする複製開始には、大腸菌の *dnaA* 遺伝子産物 (タンパク質) の *oriC* への結合が必須条件であるのに対して、プラスミドの F 因子の複製には *dnaA* の関与は不必要であると考えられてきた。従って *dnaA*⁻, *rnh*⁻ の二重変異をもつ大腸菌では、*oriC* が働かずに別の部位が新しい複製開始点として活性化され、ほぼ正常に増殖できるが、このような細胞では F プラスミドも正常に増殖できるものと期待された。しかし、この期待に反し F プラスミドの DNA は複製できないことを見出した。

この発見を端緒として、F プラスミドの自律的複製に関与する *dnaA* の作用を詳細に解析した。まず、*dnaA*⁻, *rnh*⁺, P2 *sig5* 溶原菌の中でも F は複製不能であったので、ここで関与している遺伝子は *dnaA* であることが確認された。次に、F の複製開始点がいくつかあるなかで、特に *ori2* と呼ばれる領域を起点とする複製が *dnaA* の作用に依存することをつきとめた。この領域には、*oriC* に存在する *dnaA* タンパク質結合配列 (*dnaA* ボックス) と同様の配列がみられる。そこで、制限酵素リンカー及びエキソヌクレアーゼを用いる人為的方法で、多数の段階的な欠失変異株シリーズの作製・塩基配列決定を行い、複製能との対応関係を解析した。その結果、*ori2* 領域に *dnaA* ボックスが重複して 2 個繰り返し存在する部位で、これが少なくとも 1 個健在であることがプラスミドの複製のために不可欠であることを証明した。

以上の結果及び他の補足的実験結果に基き、大腸菌 *dnaA* 遺伝子は自らの染色体 DNA のみならず、寄生的なプラスミドの複製開始にも必須の働きをすることが示された。おそらく、*ori2* の *dnaA* ボックスへ *dnaA* タンパク質が結合しなければ自律的複製は開始されないと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、大腸菌 F 因子の自律的複数機構に関する重要な新事実発見について記述したものである。すなわち、大腸菌 dnaA 遺伝子の働きは、大腸菌染色体の複製が通常の開始点 (oriC) から出発する際に不可欠であるが、F の DNA 複製には不必要と信じられてきたのに対し、F の ori2 を開始点とする自律的複製も dnaA を必要とする新事実を明らかにした。dnaA 遺伝子産物(タンパク質)と oriC との相互作用は、oriC に存在する独得のヌクレオチド配列 (dnaA ボックス) へこのタンパク質が結合し、この領域を構造的に変化させて複製開始を可能にすると考えられている。F の ori2 領域にも、dnaA ボックスのコンセンサス配列が存在するにもかかわらず、dnaA の関与が不必要とされていた矛盾は、本研究の成果により解決した。

なお、F および他のプラスミドについて、その複製開始領域に dnaA ボックス配列をもつことが知られているものは、国外の研究者たちにより相次いで dnaA の関与が報告されつつあり、本研究の成果を支持している。

一方、F の複製に dnaA は不必要とする従来の定説を支えてきた実験事実は、再吟味されることとなった。本論文ではこの問題に関し、可能なすべてのモデルを挙げて考察し、いくつかの作業仮説については今後の実験的検証を提案している。

例えば、F の DNA には複数の複製開始領域が存在し、未知の調節メカニズムによって選択的に活性化されている可能性がある。その場合、ori2 以外の開始点から出発する複製には dnaA が不必要なのかもしれない。また、プラスミドとして複製する際には ori2 は dnaA を必要としても、大腸菌染色体に組み込まれた時には、dnaA を必要としなくなるかもしれない。これらは実験的検証が可能なモデルであり、今後の研究の進展によって、現在は未知の DNA 複製調節メカニズムの解明につながるものが期待される。

いずれにせよ、本研究の成果はまた大腸菌染色体とプラスミドとの間の進化的関係を考察する上で、貴重な知見をもたらした。DNA の複製の開始を左

右する調節系で、その特異性の決定機構が鍵を握っているとすれば、dnaAボックスとdnaAタンパク質との相互作用はその1例と考えられる。

以上の審査結果から、本論文は理学博士の学位取得に充分の内容をもつものと結論した。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。

大腸菌 F 因子の複製における d n a A
遺伝子の関与に関する分子遺伝学的研究

生物物理学専攻 村上洋太

要 旨

大腸菌の複製開始にはdnaA遺伝子の機能が必須であり、dnaA遺伝子産物（DnaAタンパク質）が、大腸菌染色体の複製開始の制御において重要な役割を果たしていると考えられている。dnaA変異株では大腸菌の複製開始点、oriCからの複製ができないが、他のレプリコンが染色体に挿入すると、その複製開始点から染色体の複製がおこり、DnaAタンパク質が欠損している条件下でも細胞が増殖できるようになる（integrative suppression）。大腸菌の性因子であるF因子もdnaA変異をintegrative suppressionできることから、F因子の複製にはdnaAの機能は必要ないと考えられてきた。

一方、RNaseHが欠損するとdnaAに依存しない新たな複製開始点、oriKが活性化される。したがって、RNaseHの構造遺伝子rnhの変異によってdnaA変異が抑制されることが知られている。

我々は、rnhのアンバー変異を新たに分離し、dnaAアンバー変異及び高温感受性アンバーサプレッサーと組み合わせることによって、低温条件下ではoriCから、高温条件下ではoriKから、染色体複製を開始する株を作製した。この株の解析の過程で、F因子の自律複製に必要な領域を持つプラスミド（miniFプラスミド）が、高温条件下でこの株を形質転換できないことを見いだした。

この現象について、種々のminiFプラスミドを用いて詳細な解析を行った。その結果、ori2からの自律複製に必須の領域のみを持つプラスミドが、DnaAタンパク質欠損条件下で保持されないことが明らかとなった。また、DnaAタンパク質欠損条件下での、ori2を複製開始点として持つminiFプラスミドの挙動は、dnaA依存性の複製を行うプラスミド、pSC101と同じであった。これらの結果は、miniFのori2からの複製にdnaAの機能が必要であることを示している。

ori2からの複製にはminiFプラスミド自身がコードするrepE遺伝子産物（RepEタンパク質）が必須である。このRepEタンパク質をtransに供給している条件下でも、ori2のみを持つプラスミドはDnaAタンパク質が欠損すると保持されないことを見いだした。このことはDnaAタンパク質が直接ori2からの複製に関与していることを示唆している。

ori2内にはDnaAタンパク質が認識結合する塩基配列（DnaA box）と相同な配列があり、最も相同性の高い配列はori2の最小必須領域の端に2つ並んで存在する。このDnaA boxに欠失変異を導入したところ、2つのDnaA boxのうち少なくとも1つが完全に存在することが、ori2からの正常な複製に必要であることが明かとなった。また、亜硫酸水素ナトリウムによる*in vitro* localized mutagenesis法を用いて、1つ残ったDnaA boxに塩基置換変異を導入したところ、DnaA box内もしくはそのごく近傍の塩基置換変異によってori2の複製能が低下することを見いだした。これらの結果はこのDnaA boxにDnaAタンパク質が認識結合し、ori2からの複製に関与していることを示しているものと思われる。

一方、ori1についても検討を行ったところ、pBR322とori1のみを持つプラスミドの複合プラスミドを用いたori1がプラスミドとして保持されるのに十分なだけの複製能を持たないことが示唆された。

以上の結果とF因子によるintegrative suppression の現象について考察する。

また、上記の解析の過程で、miniFプラスミドとpBR322の複合プラスミドがDnaAタンパク質欠損条件下で宿主の増殖を阻害することが見いだされ、解析の結果ori2の複製能と密接な関係があることが判ったので併せて報告する。

略号

本論文で使用した略号は以下の通りである。

bp	ベースペア（塩基対）
kb	キロベースペア
kd	キロダルトン
Cm	クロラムフェニコール
Ap	アンピシリン
Tc	テトラサイクリン
Ts	高温感受性
BSA	ウシ血清アルブミン
EDTA	エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム
pfu	プラーク形成単位

なお、制限酵素名に付記すべき「下線」（イタリック体）はこれを省略した。

目次

第1章 序論	1
第2章 材料と方法	
[1] 菌株とファージ株	12
[2] プラスミド	12
[3] 培地	16
[4] 酵素およびDNA	18
[5] 放射性標識化合物	19
[6] 濁度の測定	19
[7] P1形質導入	19
[8] P1形質導入を用いたlocalized mutagenesis法	19
[9] DNA合成の測定	20
[10] 形質転換	20
[11] プラスミドDNAの調製	21
[12] アガロース電気泳動	21
[13] BAL31エキソヌクラーゼによる欠失変異の導入	21
[14] 亜硫酸水素ナトリウムを用いたin vitro localized mutagenesis法	22
[15] 塩基配列の決定	23
第3章 結果	24
第1節 大腸菌 <u>rnh</u> アンバー変異株の分離	24
[1] <u>das</u> 変異株の分離	24
[2] <u>das</u> 変異株の解析	25

第2節	<u>dnaA</u> 遺伝子産物欠損下でのminiFプラスミドの保持	31
[1]	miniFプラスミドによる <u>dnaA</u> 変異株の形質転換	31
[2]	DnaAタンパク質欠損条件下でのminiFプラスミドの保持	35
[3]	<u>dnaA</u> 遺伝子産物の <u>ori2</u> からの複製への関与	38
第3節	miniF, <u>ori2</u> におけるDnaA boxの必要性	43
[1]	欠失変異の導入による解析	43
[2]	塩基置換変異による解析	45
第4節	<u>ori1</u> の複製能	48
第5節	<u>dnaA</u> 欠損下でのminiF, pBR322複合プラスミド による宿主細胞の増殖阻害	51
第4章	考察	55
第1節	<u>rnh</u> アンバー変異	55
第2節	miniFプラスミドの複製でのDnaAタンパク質の関与	56
[1]	miniFプラスミドの複製におけるDnaAタンパク質の必要性	56
[2]	<u>ori2</u> からの複製におけるDnaAタンパク質の関与の仕方	57
[3]	<u>ori2</u> へのDnaAタンパク質の作用	57
[4]	Fによるintegrative suppression	59
第3節	miniFのもつ <u>ori1</u> の複製能	61
第4節	pBR322-miniF複合プラスミドによる宿主の 増殖阻害	63
文献		63
謝辞		71

第 1 章 序 論

「生命」を定義しようとする時、必ず「自己増殖能」がその中に含まれる。生命のもつ自己増殖能は、その基盤を「遺伝子の自己複製」にもつ。WatsonとCrickは、遺伝子(DNA)の構造を明らかにしたとき(133)、同時にDNAの複製のモデル「半保存的複製」を提唱した(134)。このモデルはMeselsonとStahl(81)をはじめとする多くの実験によって証明され、これによって遺伝子の複製の基本的メカニズムが明らかになった。その後、DNA複製の分子的メカニズムやその制御の問題が数々の材料、手法を用いて解析されてきた。特に近年、遺伝子工学的手法の発達にともない、DNA複製の機構は急速に明らかになりつつある。

DNA複製の機構を解析する上で、大腸菌は優れたモデル系となる。大腸菌は単細胞で単純な構造をもつとともに、遺伝的解析を容易に行うことができ、現在、地球上でその遺伝的構成が最もよくわかっている生物の1つであろう。しかしながら、この大腸菌を用いた染色体複製の遺伝的解析の結果、多くの遺伝子が関与していることが明らかになり(表1)、大腸菌のような単純な生物ですら、複雑なDNA複製機構をもっていることがわかった。そのため、更に単純な系として、大腸菌内でその複製機構の一部を利用してDNA複製を行うファージやプラスミドについての解析もすすめられてきた(総説60)。

DNAの複製は、開始、伸長、終結の3つの段階に分けることができる。複製単位(レプリコン)の複製の制御は、基本的には開始の段階で行われると思われる。大腸菌では、増殖速度が変化しても複製の伸長速度は変化せず、複製開始の頻度が増殖速度に応じて変化することが示され(39)、細胞周期とDNA複製の共役が複製の開始を通して制御されていることがわかる。このような複製開始の単純なモデルとしてJacob等が提唱した(48)レプリコンモデルがある(図1)。レプリコンは遺伝物質の複製単位をさし、レプリコン上の特定の構造(レプリケーター)と、レプリケーターを特異的に認識して複製開始をおこさせるイニシエーターの合成を支配する遺伝子からなる。レプリケーターは、各レプリコンの複製開始点と考えられる。現在まで、種々のレプリコンの解析から、複製開始点(レプリケーター)及びその開始点からの特異的な複製を行わせる因子(イニシエーター)が明

らかにされつつある。

複製開始がイニシエーターの量によって決定されると仮定すると、イニシエーター遺伝子の発現、あるいはイニシエーターの活性を調節することにより複製を制御していると推測できる。オートリプレッサーモデル（110、図2）は、イニシエーター遺伝子の発現を抑制的に調節するリプレッサーの存在を仮定することに

表1 文献（60）より修正して転載

Replication genes and proteins of *E. coli*^a

Gene	Map location, minutes	In vivo phenotype of mutant	Protein and in vitro function
<i>dnaA</i>	82	slow stop; defective origin initiation	unknown
<i>dnaB</i>	91	quick stop	<i>dnaB</i> protein; prepriming
<i>dnaC</i>	99	slow or quick stop (depending on the mutation)	<i>dnaC</i> protein complexes with <i>dnaB</i> protein; complexes with " <i>dnaT</i> protein"
<i>dnaE</i> (<i>polC</i>)	4	quick stop	subunit of <i>pol</i> III holoenzyme
<i>dnaG</i>	66	quick stop, defective initiation of fragments	primase
<i>dnaH</i>	7	slow stop	unknown
<i>dnaJ</i>	0.5	slow stop	unknown
<i>dnaK</i>	0.5	slow stop	unknown
<i>dnaL</i>	28	quick stop	unknown
<i>dnaP</i>	84	phenethyl alcohol resistance; slow stop	primase (a)
<i>dnaT</i>	95-99	regulates termination	protein i ^(b)
<i>dnaZ</i> ^b	10	quick stop	subunit γ of <i>pol</i> III holoenzyme; chain growth
<i>cou</i>	82	coumermycin (novobiocin) resistance	DNA gyrase subunit β ; nicking-closing
<i>lig</i>	51	accumulation of replication fragments	DNA ligase; covalently seals DNA nicks
<i>nalA</i>	48	nalidixate (oxolinic acid) resistance	DNA gyrase subunit α ; ATPase
<i>polA</i>	85	defective in DNA repair	DNA polymerase I; gap filling, RNA excision
<i>rep</i>	83	slowed fork movement	ATP-using helicase
<i>ssb</i>	91	quick stop	SS DNA binding protein
unknown			protein n
unknown			protein i
unknown			protein n' (ϕ X174-DNA dependent ATPase) = factor Y
unknown			protein n''
<i>nrdA</i> (<i>dnaF</i>)	48	quick stop	subunit B1 of ribonucleotide reductase
<i>dut</i> (<i>sof</i> , <i>dnaS</i>)	81	very short nascent fragments	dUTPase
<i>trxA</i>	84	phage T7 negative	thioredoxin; coenzyme of ribonucleotide reductase; subunit of phage T7 DNA polymerase

(a)本文参照、文献（93）

(b)文献（75）

より、細胞増殖に共役した複製開始を説明している。別のモデルとして、DNA複製に共役して合成される複製開始のリプレッサーの濃度が、細胞の成長にしたがって希釈され、次の複製開始がおこるという“inhibitor dilution”モデルも提唱されている(105)。

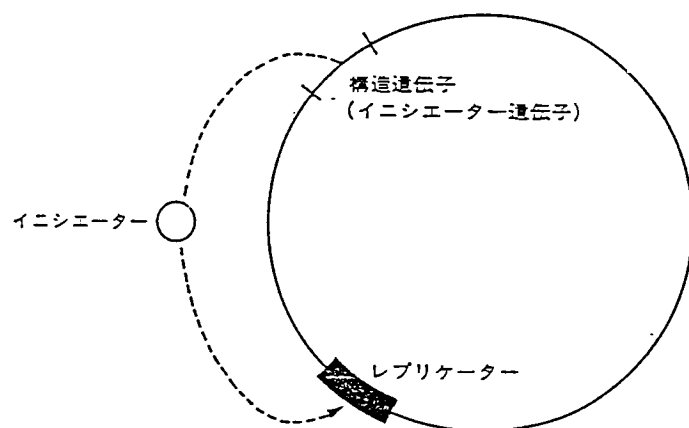


図1 レプリコン仮説 (文献(78)より転載)

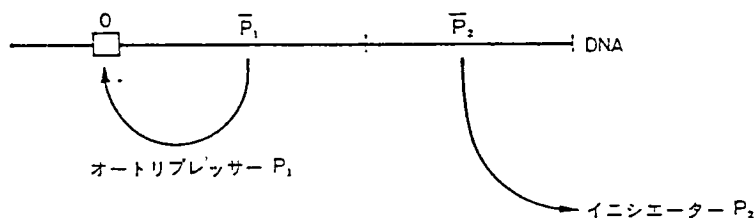


図2 オートリプレッサーモデル (文献(78)より転載)

大腸菌においては、染色体全体が1つのレプリコンを形成しており、その複製開始は染色体の特定の領域、染色体地図上84分のoriCから両方向にすすむことがわかっている(8,41,42)。表1に示す通り、このoriCからの複製には数多くの遺伝子が関与しているが、このうち複製開始に関与するものは、dnaA(41),dnaB(140),dnaC(12),dnaK(108,110),dnaP(132)がある。このうち、dnaBとdnaCについては伸長反応にも関与することが、これらの遺伝子の変異株の解析から明らかになってい

る(12,140)。

dnaKについては最近、榊原らによって、oriCからの複製開始を特異的に阻害する新たなdnaK変異株が分離されている(110)。dnaPについては我々が解析した結果、和田らによって分離されたdnaP変異株のDNA複製に関与する変異は、プライメースの構造遺伝子dnaGに起こったものであることがわかっている(93)。

dnaA遺伝子については、oriCからの複製に特異的に関与することから、その発見(41)以来、in vivo, in vitroでの解析がすすめられてきた。本研究以前に行われたそれらの解析の結果、明らかにされた主な知見を以下にまとめる。

- 1) dnaAに依存した複製を示すのは、pSC101(30)と186ファージ(43)を除いてoriCのみである。
- 2) dnaAの高温感受性変異株の染色体に、他のレプリコン—F(97),P1(17),miniP1(15),R1(88),miniR1(88),P2sig5ファージ(68)や、他のプラスミド(13,20,90,117,136,139)—が挿入すると、高温での染色体複製が回復し、菌が生育可能となるいわゆるintegrative suppressionが起こる。この場合、染色体の複製がoriCからではなく、挿入したレプリコンの複製開始点から起こっていることになり、dnaAがoriCからの複製開始に特異的に働き、挿入したレプリコンの複製開始には必要でないことを示していると考えられる。
- 3) in vivoではリファンピシンによって複製開始が阻害され、複製開始にRNAポリメラーゼが関与することが示されている(66,73,82)。dnaA変異がRNAポリメラーゼの β サブユニットの構造遺伝子rpoBに起こった、ある種の変異によって抑制されることから、RNAポリメラーゼとDnaAタンパク質が相互作用している可能性が示された。
- 4) dnaA,dnaCの変異株を使った解析からin vivoでの複製開始が、タンパク質合成阻害剤感受性段階 → dnaA,RNAポリメラーゼが関与する段階 → dnaCが関与する段階、の順に進むことが示された(62,140)。
- 5) 高温感受性のdnaA46変異から分離されたdnaA46cosは、高温耐性を示すと同時に低温感受性となる抑制変異であり、dnaA内に起こった変異と考えられ

るが、この変異をもつ株では、低温でoriCからの複製開始頻度が上昇する(52)。また、dnaA46cosの低温感受性が λ dvプラスミドや、DnaBタンパク質と相同なタンパク質を過剰生産するP1のban変異をもつファージによって抑制されることから、DnaBタンパク質とDnaAタンパク質が相互作用をもつことが予想された(31)。

- 6) dnaAは、大腸菌染色体地図上83分に位置し(4)、dnaN,recFとオペロンを形成している可能性が強い(102,106)。また、塩基配列の解析から52.5Kdのタンパク質をコードしていることが示された(35,102)。
- 7) dnaA遺伝子産物は細胞周期にかかわらず、一定量細胞内に存在する(109)ことから、dnaA遺伝子産物の量によってoriCからの複製が制御されるとは考えにくい。
- 8) in vitroのoriCプラスミド複製系を用いてdnaA遺伝子産物(DnaAタンパク質)が精製され(33)、oriC内に4ヶ所存在する特定の塩基配列(DnaA box: 5'TTAT₆CACA3')を認識結合することがわかった(34)。また、pSC101のDnaA boxをもつ複製開始点とも結合する(34)。
- 9) DnaAタンパク質は、自分自身の構造遺伝子のプロモーター領域に存在するDnaA boxに結合し(34)、自分自身の発現を抑制する(3,61)。また、dnaAの発現は damメチレーズによるメチル化によってもコントロールされている(10)。
- 10) DnaAタンパク質は、oriCプラスミドの隣に存在する16Kdのタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターに結合し、その転写を抑制する(33,118)。一方、このプロモーターからの転写は、oriCからの複製開始に影響を与えている(118)。
- 11) 精製されたタンパク質を用いたin vitro oriCプラスミド複製系の解析から(5,50,100,129)、DnaAタンパク質は複製開始反応の最初の段階でDnaCタンパク質とともにoriCに結合し、DnaBタンパク質のDNAヘリケース活性によって二本鎖DNAの開裂を起こさせることが、極めて最近のin vitro実験によって明らかにされた(5)。

以上のような知見から考えて、dnaAがoriCからの複製開始反応の制御において

重要な機能を担っていることは間違いない。

最近、大腸菌では、DNA単鎖と対合して雑種分子を形成したRNA鎖を切断する酵素であるRNaseHの失活によってoriCとは異なる複製開始点(oriK, oriH)が活性化することが示された(45,69,99)。このoriKは染色体上に数ヶ所存在するが、特に複製終結点、terC、付近に多く存在しており(22)、その複製開始はdnaAに依存しない。従って、dnaA変異がRNaseHの構造遺伝子rnhの失活によって抑制されることが見いだされている(45,69,99)。このように、oriCとは異なる複製開始点が潜在的な形で存在することは、細胞増殖と複製の制御の問題を考える上でも興味深い。

大腸菌を宿主とするファージやプラスミドの複製についてもin vivo, in vitroの両面から、精力的に研究が続けられている。特に、 ϕ X174, M13, G4などの一本鎖DNAをもつファージについては、in vitroの系で詳しく解析され、その複製の分子機構の詳細が明らかになっている(総説60)。しかしながら、このような一本鎖DNAを鋳型とする複製系で得た知見は、複製の各過程における酵素の機能を理解するためには有用であるが、大腸菌染色体をはじめとする二本鎖DNAの複製過程、特に開始、にそのまま適用することはできないと思われる。

環状二本鎖DNAの複製開始過程で現在もっともよくその分子機構がわかっているのは、ColE1プラスミドである。ColE1のin vitro複製系は富沢らにより開発され、RNAポリメラーゼ、RNaseH、およびDNAポリメラーゼIにより開始することが示された(47)。ColE1の複製開始点(RNA→DNA切り替り点)の上流555塩基のところから転写されるRNA(RNA II)が複製開始点付近でRNA-DNA雑種分子を形成し、RNaseHにより、そのRNAが複製開始点のところで切断される。その切断されたRNAの3'-OHを用いてDNAポリメラーゼIによってDNA合成が開始される。

他のプラスミドでは、複製開始および制御の分子機構の詳細は明らかにされてはいない。しかし、多くのプラスミドでは、その複製開始点が同定され、それに特異的にはたらき複製開始を起こさせるイニシエーターにあたるタンパク質の存在が明らかにされている(表2)。これらのプラスミドのうち、本研究の対象となった大腸菌の性決定因子であるFプラスミドは、そのコピー数が大腸菌染色体

表 2 文献 (130) より修正して転載

Regulatory elements in plasmid replication						
Plasmid	Requirement for		Replicon specific Initiator		Component acting negatively on initiator synthesis or activity	
	Transc-ription	Protein synth.	Design.	site of action	Design.	site of action
λ dv	yes	yes?	O protein	<u>ori</u> (4Re)	Cro protein	λ pR
R1 ⁻	no	yes	RepA-protein	<u>oriY</u>	CopA-RNA CopB-protein	<u>repA</u> -mRNA <u>repAp</u>
ColE1 ⁻	yes	no	primer-RNA derived from RNA2	<u>ori</u>	Rop-protein RNA1	RNA1/RNA2 RNA2
F ⁻	(yes) ^(a)	yes	E protein	<u>oriS</u> (<u>incB</u> 4 Re)	E protein 4 Re in <u>incB</u> 5 Re in <u>incU</u>	<u>repEp</u> (Re) E protein
Pl ⁻	yes	yes	RepA-prot.	<u>ori</u> (<u>incC</u> 5 Re) ?	RepA-protein 5 Re in <u>incC</u> 9 Re in <u>incA</u>	<u>repAp</u> (Re) RepA-prot. ?
pSC101 ⁻	yes	?	RepA	<u>ori</u> (3Re)	RepA -protein 3 Re <u>inc</u> ?	<u>repAp</u> (Re) RepA-prot. ?
R6K ⁻	?	?	Pi protein (Pir)	<u>ori</u> (<u>6</u> Re?)	Pi protein 6 Re <u>inc</u>	<u>pir-p</u> Pi protein
Chromo-some ⁻	yes	yes	DnaA prot.	<u>oriC</u> (40b)	DnaA-prot. Db's ?	<u>dnaAp</u> (1 Db) DnaA-prot.

(a) in vitro では必要ない (92)。

あたり 1～2 と低くともたれている(29)にもかかわらず、安定に保持される。本来 F 因子は 94.5Kb の大きな環状二重鎖 DNA であるが、制限酵素 EcoRI で F 因子を切断した断片のうち f 5 および f 7 断片がプラスミドとして大腸菌細胞内で自立複製能をもつことが確認された(63,72,122)。このうち f 5 断片をもつプラスミドはもとの F 因子と、宿主細胞内の保持に関して同じ性質を示し、miniF と名付けられている。f 5 断片は、F 因子の Kb 単位地図(113)で 40.3Kb-49.4Kb までの 9.1Kb の DNA 断片で、その中にプラスミドの保持に係る遺伝子として、複製に関与する遺伝子群とプラスミドの分配に関与する遺伝子が存在する(総説11)。

分配に関与する遺伝子としては sop 遺伝子群と ccd 遺伝子群の 2 種類の遺伝子群が存在する。sop 遺伝子群は sopA, sopB の 2 種類のタンパク質をコードする遺伝子と、sopB が結合すると考えられる sopC の領域からなり、複製を終えた F プラスミドが娘細胞に分配される際に重要な機能を果たすものと考えられている(総説40)。ccd 遺伝子群は ccdA, ccdB (letA, letD) 2 種類のタンパク質をコードする遺伝子からなり、宿主細胞分裂と F の増殖の共役に関与すると考えられている(86,87,101)。その作用機作について、ccd (let) をもつプラスミドが脱落した細胞を殺すというモデルが提唱されている(49)。

一方、複製に関しては、f 5 断片内に ori1 (oriV), ori2 (oriS) 2 つの複製開始点が同定されている。

ori1 は、miniF プラスミドの複製中間体の電子顕微鏡による観察から、F 因子の地図上 42.6Kb にマップされ、その複製は両方向にすすむことが報告された(26)。その後、この領域を欠失しても miniF プラスミドは、自律増殖能を失わず、もとの miniF プラスミドと保持に関して同じ性質を示すことがわかった(77)。この時、45.07Kb のところに新しい複製開始点が形成されることが電子顕微鏡による観察から明らかにされ(27)、ori2 (oriS) と名付けられた。その後、ori1 についての解析はすすんでいないが、ori2 領域を欠失した f 5 断片を pBR322 とつないだ複合プラスミドを用いた解析から、ori1 からの複製開始には、ori1 のすぐ上流に存在する 37Kd の pifC (repC) 遺伝子産物および ori2 からの複製にも必須の RepE タンパク質、そして、ccdB のすぐ上流にコードされる 28Kd のタンパク質が必要であることが示された(64,120,121)。さらには ori2 内にある RepE タンパク質の結合領域である incB 領域も ori1 からの複製に必要ならしいことも報告されている(23)。しかし、本研

究において、ori1がプラスミドとしての自律複製能をもたない、つまり複製開始点として機能しないことを強く示唆する結果を得た（第3章6節）。ori1の機能については第4章で議論する。

ori2については、くわしい解析がすすんでいる。ori2からの複製はori1とは異なり一方向（ccdがある方向）にすすむ(27)。ori2からの複製にはori2と並んで存在するrepE遺伝子産物が必須であり(59,75,124,135)、repEとori2だけを含むDNA断片だけで自律複製能を示す(94)。室津らによってこの領域の塩基配列が決定され(94)、さらに、transにRepEタンパク質を供給した時に、複製を行うori2の最小必須領域が決定された(95)。この217bpのori2の最小領域内にはRepEタンパク質が認識結合する19bpからなる4つのdirect repeat(123)、及び約50bpのATの豊富な領域が存在する。また、この最小領域内にはDnaA boxと相同性をもつ塩基配列が3ヶ所存在する（図4）。

miniFのコピー数がrepEの変異によって上昇するなどの知見にもとづき、miniFの複製開始の制御は、イニシエータータンパク質にあたるRepEタンパク質によって行われていることが予想された(55,56)。その制御は、2つの方法で行われている。1つは、RepEタンパク質がrepEのプロモーター領域の配列（ori2内のdirect repeatと相同性をもつ配列が2つ逆位で存在する）に結合することで、発現の自己制御を行い、細胞内のRepEタンパク質の量を調節することによって、複製開始を制御する方法である(105,107,123)。もう1つは、repEの下流に存在するori2内と同じ5つのdirect repeatにRepEタンパク質が結合することで、過剰のRepEタンパク質が「希釈」されることによる制御である(55,56,57,123)（図3）。このような2つの機構により細胞内のRepEタンパク質の濃度が調節され、miniFプラスミ

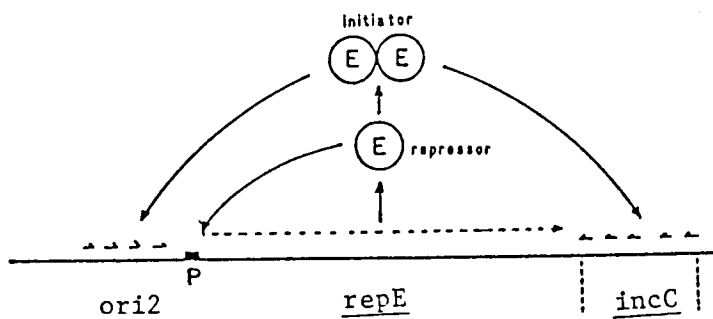


図3 ori2におけるコピー数の調節
文献(57)より転載。EはRepEタンパク質、pはrepEのプロモーターを示す。→はRepEタンパク質の結合するdirect repeatを示している。

ドのコピー数が1定に保たれている。同様の機構によるコピー数の制御はP1プラスミドでも見出されている（総説16）。しかしながら、宿主細胞の染色体複製制御とFプラスミドの複製制御の関係についてはあまりわかっていない。

FやP1がdnaA変異をintegrative suppressionすることができることから、これらのプラスミドの複製にはDnaAタンパク質は不要であると考えられてきた。しかし、どちらのプラスミドも複製開始領域にDnaA boxをもっており、さらにはdnaA依存性の複製を行うpSC101と、その複製開始領域の構造が類似している（図4）。このFやP1の複製開始領域に存在するDnaA boxがどのような意味をもつかは不明であった。

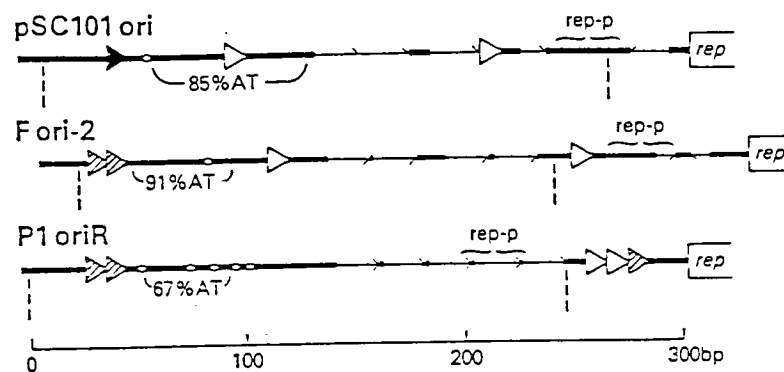


図4 pSC101, miniF, miniP1の複製開始点の比較

文献（36）より転載した。点線ではさまれた領域が各複製開始点の最小必須領域を示す。黒、斜線、白、の各三角はそれぞれDnaA boxの共通配列と、同じ、1塩基異なる、2塩基異なる、塩基配列を表している。rep-pはそれぞれのプラスミドの複製開始に必須のタンパク質をコードする遺伝子(rep)のプロモーターを示している。矢印はRepタンパク質が結合するdirect repeatをしめし、○印はGATCの塩基配列を示している。pSC101とminiFori2の複製は図の左向きに進む。

本研究では、新たに分離した rnh のアンバー変異もしくは P2sig5 ファージの溶原化によって、dnaA 変異を抑制した株を用いた解析から、miniF プラスミドの ori2 からの複製には DnaA タンパク質の機能が必須であり、おそらく、DnaA タンパク質が ori2 内の DnaA box に結合し、複製開始に直接関与するであろうことを明らかにした。またその解析の過程で、miniF と ColE1 プラスミドの複合プラスミドが、DnaA タンパク質欠損下で宿主の生育を阻害する現象を見出した。F プラスミドによる integrative suppression についての考察とともに、この増殖阻害の機構についても議論する。

第二章 材料と方法

[1] 菌株とファージ株

本研究において使用した菌株及びファージ株を表3、4に示す。菌株はすべて大腸菌 K 1 2 である。

[2] プラスミド

本研究において用いたプラスミドの由来、文献、レプリコン、及び形質転換体の選択に用いた薬剤耐性のマーカーを表5に示す。

pPOR/Hは、pBR322のものとEcoRI部位を消失させたのち、アンピシリン耐性遺伝子 bla のすぐ下流のAhaIII部位にEcoRIリンカーを挿入し、PvuII部位にHindIIIリンカーを挿入したもので（図11参照）、本研究所の今井六雄博士より頂いた。

pKV513は、miniFの ori2 と repE 及びトランスポゾンTn3由来のアンピシリン耐性遺伝子 bla をもつものである（図8）。pKV704は、大阪大学の時野氏によって作られた、repE の構造遺伝子に trpL プロモーター及び λ cro のSD配列をつないだDNA断片を、pACYC184(14)のHindIII-BamHI部位に挿入したものである（図11）。pKV513, pKV704ともに、本研究室の和田千恵子氏によって作成されたものを頂いた。

pKP10136は、pKP1013のminiFおよびクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むEcoRI断片を、pBR322のHindIII-EcoRI部位に挿入したものである。pK11181は、pKP1013の repE にアンバー変異が起こったプラスミドpKP1118(75)をもとに、そのプラスミドをpBR322のBamHI-EcoRI部位に挿入したものである。pKP10136, pK11181ともに今井六雄博士により作成されたものを頂いた。また、pZK74は、pKP1013のクロラムフェニコール耐性遺伝子を含むPstI DNA断片をpUC18のPstI部位に挿入して作った。

pZK58は次のような方法で作成した。pKP10136のminiF ori2, repE を含むXhoI-KpnI断片をpUC18のマルチクローニング部位のSalI-KpnIに挿入し、pZK51を得た。次に、pZK51をHindIIIとEcoRIで切断し、その結果生じる、ori2, repE を含む約2 KbのDNA断片をpBR322のHindIII-EcoRI部位に挿入した。

表3 使用した大腸菌株

Strain	Genotype ^(a)	Derivation, reference or source
KH1192	<u>metD88</u> <u>metB1</u> <u>proA3</u> <u>lac-3</u> <u>tsx-76</u> <u>relA1</u> ;Hfr Cavalli	(45), T.Horiuchi
KHG109	KH1192 <u>rnh::Tn3</u>	(74). T.Horiuchi
KN1125	KH1192 <u>dnaA5</u> (Ts)	T.Nagata
YT189	KN1125 (ϕ 80pSu3 ⁺)	lysonization of the phage
YT193	KH1192 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>proA</u> ⁺ <u>metD</u> ⁺	P1:Tn10 pool ^(c) / KH1192 ^(b)
YT194	KH1192 <u>zaf-8::Tn10</u>	P1:YT193/KH1192
YT197	KH1192 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>metD</u> ⁺	P1:YT193/KH1192
YT198	YT189 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>rnh-198</u> (Am) <u>proA</u> ⁺	Localized mutagenesis
YT199	KN1125 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>rnh-199</u> (Am) <u>metD</u> ⁺	Localized mutagenesis
YT200	KN1125 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>rnh-200</u> (Am?) <u>metD</u> ⁺	Localized mutagenesis
YT201	KN1125 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>rnh-198</u> <u>proA</u> ⁺	P1:YT198/KN1125
YT202	KN1125 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>rnh-199</u> <u>metD</u> ⁺	P1:YT199/KN1125
YT203	KN1125 <u>zaf-8::Tn10</u> <u>rnh-200</u>	P1:YT200/KN1125
YT231	KN1125 <u>rnh-199</u> <u>proA</u> ⁺ <u>metD</u> ⁺	P1:W3110/YT202
YT234	KN1125 <u>metD</u> ⁺ <u>rnh-199</u>	P1:YT231/KN1125
YT236	KN1125 <u>rnh-199</u> <u>proA</u> ⁺ <u>metD</u> ⁺	P1:W3110/YT234

表3 つづき

KH5402-1	<u>ilv thr metE trpE9829</u> (Am) <u>tyrA</u> (Am) (54) <u>thyA deo supF6</u> (Ts);F ⁻	
KY8422	KH5402-1 <u>ilv⁺ dnaA17</u> (Am) (54)	
YT221	KY8422 <u>zaf-8::Tn10 rnh-198</u>	P1:YT198/KY8422
YT224	KY8422 <u>zaf-8::Tn10 rnh-199</u>	P1:YT199/KY8422
YT282	KY8422 <u>zaf-8::Tn10 proA3</u>	P1:YT197/KY8422
YT297	KY8422 <u>rnh-199</u>	P1:YT199/YT282
YT325	KH5402-1 <u>zaf-8::Tn10 proA3</u>	P1:YT197/KH5402-1
YT378	KH5402-1 <u>rnh-199</u>	P1:YT199/YT325
HfrT463(P2sig5)	<u>dnaA46</u> (Ts) <u>thi thyA metE</u> ;HfrP4x (68). Y.Hirota (P2sig5) ^(d)	
KN1128	KN250 <u>zih-5::Tn5 polA1</u>	T.Nagata
YT322	HfrT463(P2sig5) <u>zih-5::Tn5</u>	P1:KN1128/ HfrT463(P2sig5)
YT341	KY8422 <u>zih-5::Tn5</u> (P2sig5) ^(d)	P1:YT322/KY8422
KN250	<u>ilv thr his trpE9829 tyrA</u> (Am) <u>thyA</u> (44) <u>supD126</u> ;F ⁻	
KN990	KN250 <u>ilv⁺ dnaA5</u>	T.Nagata
KN1491	KN990 <u>rnh-199</u>	T.Nagata
KK167	<u>tna ilv trp dnaA46 lac'Z</u> (Oc) <u>str</u> <u>bglBR</u>	M.Kimura
YT128	KK167 <u>zid-131::Tn5 dnaA⁺ tna⁺</u> <u>bglB⁺R⁺</u>	P1:Tn5 pool(c)/ KK167
YT134	KK167 <u>zid-131::Tn5</u>	P1:YT128/KK167
YT150	KN250 <u>dnaA46 zid-131::Tn5</u>	P1:YT134/KN250
YT240	KN250 <u>polA1 zih-5::Tn5</u>	P1:KN1128/KN250
W3110	Prototroph	
YT273	W3110 <u>zih-5::Tn5 polA1</u>	P1:KN1128/W3110

表3 つづき

MM386	<u>polA12</u> (Ts) <u>rha</u> <u>lac</u> <u>rpsL</u>	(89), T.Nagata
HI1006	<u>recA1</u> <u>trpA38</u> <u>araD139</u> <u>lacIpoZYx74</u>	Derived from
	Δ (<u>ara-leu</u>)7679 <u>galU</u> <u>galK</u> <u>rpsL</u> ;F-	MC4100 by M.Hirano

- (a) 遺伝子記号は文献(4)に従った。Ts : 高温感受性; Am : アンバー変異;
Oc : オーカー変異
- (b) P1 : A/B は供与菌をA、受容菌をBとしてP1形質導入を行ったことを示す。
- (c) Tn10 pool, Tn5 pool はそれぞれTn10, Tn5がrandomに染色体上に挿入したプールから調製したP1溶菌液を使用したことを示す。
- (d) このP2sig5は87分のattP2 IIに溶原化している。

表4 使用したファージ

Strain	Source or reference
P1vir	T.Nagata
ϕ 80pSu3 ⁺ (<u>1yrT</u> or <u>supF</u>)	(1)
λ i ²¹ Su1 ⁺ (<u>supD</u>)	H.Ozeki
P2sig5	(68)
P2vir ^(a)	T.Nagata
P2c ^(a)	T.Nagata
λ i ²¹ <u>dnaA</u> -2(del213)	(111, 185)
M13mp11	(83)

(a) P2vir3, P2c は P2sig5 溶原菌の免疫性の確認に用いた。

表5 使用したPlasmid

Plasmid	Replicon	Marker ^(a)	Source or Reference
pBR322	ColE1	Ap,Tc	(9)
pPOR/H ^(c)	ColE1	Ap,Tc	M.Imai
pUC18	ColE1	Ap	Toyobo
pZK74	ColE1	Ap,Cm	This work
pSC101	pSC101	Tc	(19)
pSC138	miniF	Ap	(122), T.Miki
pKP1013	miniF	Cm	(75). T.Miki
pKV513 ^(c)	miniF	Ap	C.Wada
pKV704 ^(c)	ColE1	Cm	C.Wada
pKP1033	ColE1::miniF ^(b)	Ap,Tc	(87), T.Miki
pKP10136 ^(c)	ColE1::miniF ^(b)	Ap	M.Imai
pKP11181 ^(c)	ColE1::miniF ^(b)	Ap	M.Imai
pZK58 ^(c)	ColE1::miniF ^(b)	Ap	This work
pKH100::Tn3-2	P15	Ap,Tc	(74), T.Horiuchi
pKH100::Tn3-16	P15	Ap,Tc	(74), T.Horiuchi
pK032X	ColE1::miniF ^(b)	Ap	(120). C.Wada

(a) それぞれのプラスミドの持つ薬剤耐性を示す。Ap:アンピシリ耐性；

Tc:テトラサイクリン耐性； Cm:クロラムフェニコール耐性

(b) ColE1とminiFの複合レプリコンであることを示す。

(c) プラスミドの作製に関しては本文参照。

[3] 培地

以下の組成の培地を用いた。なお、寒天培地は1.2%の寒天（新日海社）を含む。

最小培地（M E 培地）（130）

0.02%	MgSO ₄
0.2%	クエン酸
1%	K ₂ HPO ₄
0.35%	NaNH ₄ HPO ₄
2 μg/ml	ビタミンB ₁

炭素原として0.5%グルコースを用いる。必要に応じて25 μg/mlのアミノ酸を補った。またM E培地にカザミノ酸（0.3%:Difco社製）、トリプトファン（25 μg/mlおよびチミン（50 μg/ml）をくわえたものをM Eカザミノ酸培地として用いた。

P 培地（96）

1%	ポリペプトン（Difco社製）
0.5%	NaCl
NaOHにより pH7.4に調整	

P G 培地（96）

2%	ポリペプトン
0.5%	NaCl
0.2%	グルコース
NaOHにより pH7.4に調整	

λ 培地

1%	ポリペプトン
0.25%	NaCl

L 培地

- 10% バクトトライプトン (Difco社製)
- 5% イースト エキストラクト (Difco社製)
- 5% NaCl

NaOHにより pH7.4に調整

L, P, λ 培地を上層寒天培地として用いる場合、0.7% (L 培地では0.5%) の寒天を加える。

以上の培地を使用して高チミン要求性株を増殖させる場合は25 μ g/mlのチミンを、また低チミン要求性株を増殖させる場合は10 μ g/mlのチミンを補った。抗性物質は以下に示す濃度で添加した。

アンピシリン (明治製薬)	50 μ g/ml (25 μ g/ml)
クロラムフェニコール (明治製薬)	20 μ g/ml
テトラサイクリン (ベーリンガー マンハイム)	25 μ g/ml (10 μ g/ml)
カナマイシン (明治製薬)	20 μ g/ml

()はコピー数の低いプラスミドを選択する場合に用いた濃度を示す。

[4] 酵素およびDNA

本研究で使用した制限酵素は表6に示す。反応はすべて37°Cで行った。

この時の反応液の組成は、20mM Tris·HCl (pH7.6), 20mM MgCl₂, 1.25mM DTT, 300 μ g/ml BSA, 0~150mM NaClとした。T4DNAリガーゼ (宝酒造)、T4DNAポリメラーゼ (宝酒造)、アルカリンフォスファターゼ (仔牛腸、ベーリンガー マンハイム) の反応は文献(127)に従った。またHindIIIリンカー (5'-GCAAGCTTGC-3') は Bethesda Research Laboratoryのものをを使用した。

表 6 使用した制限酵素

BamHI	東洋紡
BglII	東洋紡
ClaI	東洋紡
EcoRI	東洋紡
HindIII	東洋紡
HinfI	宝酒造
KpnI	宝酒造
PstI	東洋紡
PvuII	東洋紡
SalI	東洋紡
XhoI	東洋紡

〔 5 〕 放射性標識化合物

[2-¹⁴C]チミン(54.5mCi/mmol)は、New England Nuclear Corporationより、
[α-³²P]-dCTP(700Ci/mmol)は、ICN Radiochemicalsより購入した。

〔 6 〕 濁度の測定

クレット・サマーソン光電比色計でNo.54フィルターを使用して測定した。

〔 7 〕 P 1 形質導入

Plvirファージは、プレート法もしくは液体法を用い、富沢(125)の方法にしたがって調製し、形質導入は池田と富沢(46)の方法に従い行った。

〔 8 〕 P 1 形質導入を用いたlocalized mutagenesis法によるdas変異の分離

木村らがdnaAのアンバー変異を分離するときに用いたのと同じ方法(54)を用

いた。

rnhのごく近傍にTn10が挿入した株、YT194からPlvir溶菌液（約 10^{10} pfu/ml）を高速遠心（50,000G／1時間）により、100倍に濃縮し、10mM CaCl₂入りのL培地に懸濁する。

この懸濁液に対し、6倍の0.45M塩化ヒドロキシルアミン、2mMEDTA、10mM CaCl₂入りの溶液（pH7.6）を加え37℃で約18時間保温する。この処理後、急冷により反応を停止し50000G 1時間の遠心でファージを集め、沈澱を10mM CaCl₂入りのL培地に懸濁する。

形質転換の受容菌にはdnaA5をもつKN1125株を用い、テトラサイクリンを含むL培地上で1晩培養後、42℃にうつし出現したコロニーについて純化をおこない以後の解析に用いた。

[9] DNA合成の測定

MEカザミノ酸培地を用いておこなった。標識化合物として¹⁴C-thymineを1.4 μ Ci/ml加える。低濃度チミン要求株は、この標識化合物に含まれるチミンの量で充分生育する。この培地で、増殖させた培養液から1回に50 μ lずつとり、Whatman 3MM フィルター上に滴下し、ただちに冷却した5 % TCA溶液にひたす。このフィルターを2回の5 % TCA洗浄の後、エタノールで2回洗浄し乾燥させ、トルエンシンチレーションカウンターで放射能を測定する。

[10] 形質転換

(A) カルシウム法

文献(91)に従った。ただし、細胞を増殖させる培地として10mM MgSO₄を含む培地を使用し、0.1M MgCl₂による細胞の洗浄は行わなかった。

(B) FSB法

主に文献(134a)に従った。

(C) コロニー形質転換法

主に文献(134a)に従った。ただし、細胞の処理に用いる溶液は(B)に用いるバッファーからglycerolを除いたものを用いた。

上記の各方法のうち(A)は、主としてHI1006株を形質転換する場合に用いた。(B)法は、HI1006を除くほとんどすべての株について用いた。但し、用いるDNA濃度が高く形質転換効率が低くても問題がない場合はもっぱら(C)法を用いた。

1 1] プラスミドDNAの調製

(A) アルカリ溶菌法

文献(76)に従った。

(B) ボイリング法

文献(76)に従った。ただし、イソプロパノールによるDNAの沈澱を行う前に一度フェノール・クロロフォルム抽出を行った。

(A),(B)どちらの方法で得たDNAとも、制限酵素による切断反応、T4DNAリガーゼによる結合反応に用いることができた。

(B)法は、(A)法に比べてDNAの調製に要する時間が短く、少量のサンプル(1~5ml)からコピー数の高いプラスミドのDNAを調製する場合に、もっぱら(B)法を用いた。一方、(A)法の方が(B)法と比較して染色体DNAの混入が少なく、コピー数の少ないプラスミドの調製の場合は主にこちらを用いた。なお、大量のDNAを精製する場合はコピー数の高いものでは150~120ml、低いもので500ml~1000mlの培養液から(A)法によりプラスミドDNAを調製し(ただしフェノール抽出ははぶく)、EtBr-CsCl密度勾配超遠心法によってさらにプラスミドDNAを精製した。

1 2] アガロース電気泳動

和光純薬のアガロースII、Sigma社のアガロース(type II)を使用し平板ゲルで行った。アガロース濃度は目的に応じて0.6%~2%とし、20~250Vで泳動した。泳動緩衝液は1mMEDTAを含む44.5mMトリス-ホウ酸緩衝液もしくは2mMEDTAを含む40mMトリス-酢酸緩衝液を用いた。

1 3] BAL31エキソヌクレアーゼによる欠失変異の導入

pZK58をHindIIIで切断後、Perbal(104)の方法にしたがってBAL31(宝酒造)で処理する。保温は37℃で行い、2分間隔でサンプリングして、バッファーで飽

和したフェノールと混合し反応を停止する。サンプルの一部をPstIで切断後、BAL31によるDNAの消化の程度を0.7%アガロース電気泳動によって決定し、DnaA box付近まで消化されたと思われるものを選ぶ。次にBAL31で消化されたDNA断端をT4DNAポリメラーゼで修復した後、HindIIIリンカー存在下でT4DNAリガーゼによる結合を行う。反応液を用いてHI1006を形質転換する。それぞれの形質転換体から調製したプラスミドについて、Bgl IIとHindIIIによる切断によって出現する、DNA断片の大きさから欠失変異の大きさをはかると同時に、polA⁻株であるYT273を形質転換し、その形質転換能を調べた。それぞれの欠失変異について、その欠失の範囲を決めるために、それぞれのプラスミドの欠失部分を含む、SalI-Bgl II断片をM13mp11に挿入し、ダイデオキシ法により塩基配列を決定した。

[1 4] 亜硫酸水素ナトリウムを用いたin vitro localized mutagenesis法

(1) 一本鎖部分をもつ開環DNAの作成

pZK81をEcoRI、pZK83をHindIIIで切断後、等量ずつ混合する。混合液を100℃で1.5分熱した後、室温まで徐冷する。アガロース電気泳動パターンから全DNA分子の約40%がheteroduplexを形成し、開環DNAの位置に泳動されていた。

(2) 亜硫酸水素ナトリウム処理

主として文献(2、114)の方法に従った。(1)で得た混合液に、3倍量の作りたての4 M亜硫酸水素ナトリウム溶液(156mgのNaHSO₃, 64mgのNa₂SO₃を0.43mlの脱イオン水に溶かしたもの)を加え、0.04倍量の50mMヒドロキノンを加える。その後パラフィンオイルを混合溶液上層にのせた後、暗黒中、37℃で2時間保温する。反応を停止するために、保温した溶液を次の順序で透析する。

- ① 1000倍量の5 mMリン酸カリウム溶液(pH6.8)、0.5mMヒドロキノン液中で0℃2時間の透析を2回
- ② 1000倍量の5 mMリン酸カリウム(pH6.8)液中で0℃4時間
- ③ 1000倍量の0.2Mトリス塩酸(pH9.2), 50mMNaCl, 2mMEDTA液中で37℃24時間
- ④ 1000倍量の2 mMトリス塩酸(pH8.0), 2mMNaCl, 0.2mMEDTA液中で4℃で6～12時間

透析後、一度エタノール沈澱を行い、T4DNAポリメラーゼによって一本鎖部分の修復を行う。その反応液を用いてHI1006を形質転換する。それぞれの形質転換体から調製したプラスミドDNAを用いて、[14]と同様YT273の形質転換を行いそれぞれのプラスミドの形質転換能を調べる。

1 5] 塩基配列の決定

(A) M13を用いたダイデオキシ法

文献(83)に従い、M13mp11を用いて行った。反応液、プライマー(15mer)、DNAポリメラーゼ I Klenow断片等は宝酒造のM13シーケンス用キットのものを用了。

(B) プラスミドを用いたダイデオキシ法

文献(38)に従って行った。ベクタープラスミドにはpUC18を用いた。鋳型DNAは文献通りアルカリ法で調製したものの他に、ボーリング法によって調製したもの、EtBr-CsCl密度勾配遠心で精製したDNAなどを用いた。シーケンスゲルのパターンはEtBr-CsCl法で精製したものが一番バックグラウンドがなく、アルカリ法ついでボーリング法の順でバックグラウンドが高くなる。反応液、プライマー(15mer)等は(A)と同じ宝酒造のM13シーケンスキットのものを用了。

第3章 結果

第1節 大腸菌 rnh アンバー変異株の分離

[1] das 変異株の分離

大腸菌においてRNaseHの活性が欠損すると、本来の複製開始点(oriC)とは異なる複製開始点(oriK, oriH)が活性化する。このoriKからの複製開始には、oriCからの複製開始に必須であるdnaA遺伝子産物は必要でない。そのためRNaseHの構造遺伝子rnhに起こった、RNaseHが失活するような変異は、dnaAの変異を抑制する、いわゆるDas(dnaA suppressor)表現形を示す(45, 69, 99)。この様なoriKからの複製開始を、培養温度によって制御するために、rnhのアンバー変異を分離し、高温感受性アンバーサプレッサーと組み合わせることを考えた。

rnhのアンバー変異の分離は、P1形質導入を用いたlocalized mutagenesis法で行った。rnhとP1形質導入による連関率で約90%の位置に挿入されたトランスポゾンTn10(zaf-8::Tn10)のもつテトラサイクリン耐性を、rnh近傍の選択マーカーとして用いた。またrnhに変異が起こっても、それ単独では菌の生育に大きな影響はなく、変異株のスクリーニングに有用な表現形を示さないことが予想されたので、前述のDas表現形を指標にしてrnh変異株の分離を試みた。

zaf-8::Tn10をもつYT194株から調製したPl_{vir}溶菌液をヒドロキシルアミンで処理した後、dnaAの高温感受性(Ts)変異であるdnaA5をもつKN1125もしくはYT189株を受容菌としてP1形質導入を行った。そしてMEカザミノ酸培地上でテトラサイクリン耐性(Tc^R)を示すと同時に高温耐性(Ts⁺)となるものを選択した。

dnaAは大腸菌染色体上83分に位置し、5分付近に存在するzaf-8::Tn10とは、P1形質導入による連関を示さない。したがって、ここで得られたTc^R, Ts⁺株ではTn10の近傍に起こったDas表現形を示す変異によって、dnaA5の高温感受性が抑制されていると考えられ、おそらくその変異はrnhにおきた変異であることが期待される。また、選択の際MEカザミノ酸培地を用いたのは、rnh変異株が、栄養培地感受性を示すことが報告されていたためである(99)。しかし、18株のTc^R, Ts⁺株

は栄養培地（L培地）上で正常に生育した。18株のTc^R,Ts⁺株のうちアンバー変異を持ったものを選択するために、それぞれの株にアンバーサプレッサーを持つ形質導入ファージ、φ80pSu3⁺、もしくはλpSu1⁺を溶原化させた。もし、Das表現形がアンバー変異によるものであれば、アンバーサプレッサーによりアンバー変異が抑制された結果、再びdnaA5の高温感受性を示すようになるはずである。実際に18株中3株（YT198,YT199,YT200）がφ80pSu3⁺,λpSu1⁺の溶原化により高温感受性を示した。これら、3株のもつDas表現形を示す変異をそれぞれ、das-198,das-199,das-200と名付け、さらに詳細な解析を行った。

[2] d a s 変異株の解析

（ A ） 種々のdnaA変異の抑制

YT198,199,200の持つdas変異が、rnhアンバー変異であるなら、dnaA5変異だけでなく、他のdnaA変異も抑制できるはずである。YT198,199,200をそれぞれ供与菌、dnaA5,dnaA46,dnaA17変異をもつ株(KN1125,KK167,KY8422)を受容菌として、Tn10のTc^Rを選択マーカーとするP1形質導入を行った。dnaA46,dnaA5はミスセンス変異であり、dnaA17はアンバー変異でKY8422は高温感受性アンバーサプレッサー、supF6を持つため高温感受性を示す。P1形質導入の結果、上記3つのどの受容菌においても、得られたテトラサイクリン耐性を示す形質導入菌のうち、約90%が高温耐性をしめした（データは略）。このことから、das変異はzaf-8::Tn10のごく近傍におきたもので、dnaA5以外のdnaA変異も抑制することがわかる。

（ B ） アンバー変異の確認

（ A ）でKN1125(dnaA5)を受容菌とするP1形質導入の結果得たTc^R,Ts⁺菌を用いて、もう一度これらのdas変異がアンバー変異であることを確認した。その結果を表7にしめす。das-198,-199,-200、いずれの変異においても、φ80pSu3⁺の溶原化により再び高温感受性を示すようになるが、その程度はもとのKN1125株にくらべて低い。これはそれぞれの変異に対するアンバーサプレッサーの抑制能が完全

でないことを反映しているのであろう。das-200変異では特に、アンバーサプレッサー,supFによる抑制の程度が低いため、以後の解析はdas-198,-199についておこなった。

表 7 das変異株のアンバーサプレッサーによるDas表現形の抑制

Strain	Genotype	Ratio 42°C/30°C ^(a)	
		No lysogen	φ 80pSu3 ⁺
KN1125	<u>dnaA5</u> <u>das</u> ⁺	1.2×10^{-8}	8.9×10^{-7}
YT201	<u>dnaA5</u> <u>das-198</u>	1.2	1.4×10^{-2}
YT202	<u>dnaA5</u> <u>das-199</u>	1.3	1.3×10^{-2}
YT203	<u>dnaA5</u> <u>das-200</u>	1.2	6.0×10^{-1}

(a) 30°Cの1晩培養液を適当に希釈してL培地上にまき、30°C、42°Cで1晩培養後、コロニー数を測定する。その30°Cと42°Cでのコロニー数の比を求めた。いずれの株においても30°C1晩培養液中の生菌数は、ほぼ 1×10^9 cells/mlであった。

(C) das変異のマッピング

das-198,das-199について、近傍の遺伝的マーカー、proA,metD,zaf-8::Tn10を用いてP1形質導入を行った。その結果を図5に示す。これらの値は、既に報告されているrnh遺伝子の位置(69,126)とよく一致する。

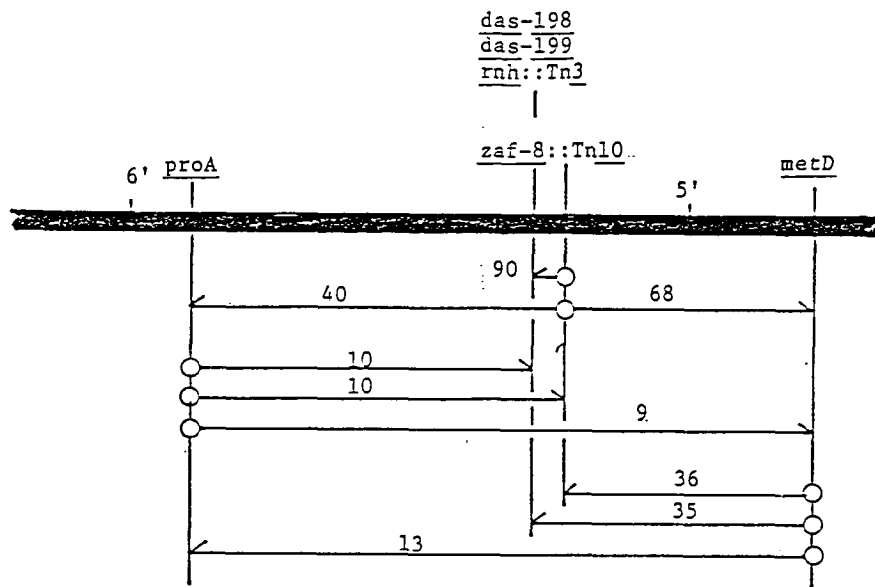


図5 das-198, -199 のマッピング

○印は選択マーカーとして用いた遺伝子、矢印の頭は非選択マーカーをしめす。それぞれの数字はP1形質導入ファージによる同時形質導入の頻度を示す(%)。なおrnh変異のマッピングはすべてDas表現形を指標におこなった。

(D) 相補性試験

das-198, das-199がrnhに起こった変異であることを確認するために、rnh遺伝子を含むDNA断片を持つプラスミドを用いて相補性試験をおこなった。

rnhはDNAポリメラーゼIIIのεサブユニットの構造遺伝子であるdnaQ(25,112)と隣接しており、互いに逆方向に転写されることがわかっている(25,74)。相補性試験に使用したプラスミドは、このdnaQとrnhを含むEcoRIDNA断片を、pACYC184のEcoRI部位に挿入したもので、pKH100::Tn3-2は、トランスポゾンTn3がrnh, dnaQ両遺伝子の外側に挿入しており、rnh⁺, dnaQ⁺を持つ。pKH100::Tn3-16はdnaQ内にTn3が挿入しており、rnh⁺, dnaQ⁻となっている(74)。この2種のプラスミドは九州大学の堀内嵩博士が作製されたものを分与して頂いたものである。これらのプ

ラスミドを用いて、(A)で得た dnaA17 , supF6 の他に rnh-198 もしくは rnh-199 をもつ3重変異株(YT221, YT224)を形質転換し、その形質転換体の高温感受性を調べた。

表8に示す通り、YT221, YT224両株とも $\text{pKH100::Tn3-2, -16}$ どちらのプラスミドで形質転換された場合でも高温感受性を示す。また、この高温感受性は、もとのKY8422と同じく、 dnaA の形質導入ファージ $\lambda \text{dnaA}\Delta\text{el213}$ によって抑制されることから、 dnaA17 変異に由来するものであることがわかる。また、 pKH100 の大腸菌染色体由来のDNA断片上には塩基配列でみるかぎり、 rnh と dnaQ 以外の遺伝子はコードされていない(74)。以上の結果は、 das-198 , das-199 のDas表現型が、プラスミド上の rnh^+ によって相補されたことを示している。

表8 das 変異の rnh 遺伝子を持つプラスミドによる相補性試験

Strain (Genotype)	Plasmid	Cell growth ^(a)	
		30°C	42°C
YT221 (dnaA17 , das-198 , supF6)	No	++	++
	pKH100::Tn3-2	++	-
	(dnaQ^+ , rnh^+)		
	pKH100::Tn3-16	++	-
	(dnaQ , rnh^+)		
YT224 (dnaA17 , das-199 , supF6)	No	++	++
	pKH100::Tn3-2	++	-
	(dnaQ^+ , rnh^+)		
	pKH100::Tn3-16	++	-
	(dnaQ , rnh^+)		

(a) それぞれのプラスミドによる30°Cで得た形質転換体の選択寒天培地上での生育を示す。

(E) das変異における「安定DNA合成」

RNaseHの活性を欠損した株では、クロラムフェニコール等によって、タンパク質合成が阻害されてもDNA合成が続く「安定DNA合成」(Stable DNA replication)がみられる(Sdr表現型)(45,99)。das-198,das-199変異でもSdr表現型を示すかどうかを調べた。(図6)。

実験に用いたのは〔D〕で用いたYT221,YT224株である。両株とも高温感受性サプレッサーsupF6をもつ。従って30℃ではdas-198,das-199ともに抑制されるが42℃では抑制されないものと考えられる。図6は、YT221,224両株とも30℃ではクロラムフェニコール添加後、約2時間でDNA合成が停止することを示している。一方、42℃で培養を続けたものでは、図6で示す通り、das⁺の対照(KH5402-1)ではクロラムフェニコールの添加によって、約1時間程度でDNA合成が停止するのに対し、YT221,YT224株ではクロラムフェニコール添加後5時間たってもDNA合成が続く。これはdas-198,das-199変異にによって「安定DNA合成」がおこっていることを示しており、両変異をもつ株ではアンバーサプレッサーが失活するとSdr表現型を示すことがわかる。また、42℃でクロラムフェニコールを加えないものではDNA合成が正常に続くことから、dnaA17によるDNA合成の不能(54)がdas変異によって抑制されていることもわかる。

以上(A)～(E)までの解析結果から、das-198,das-199がともにrnhにおこったアンバー変異であると結論し、それぞれrnh-198,rnh-199と名付けた。調べた限りにおいて、両変異の表現型にはほとんど差がない。以後の解析にはrnh-199を用いている。

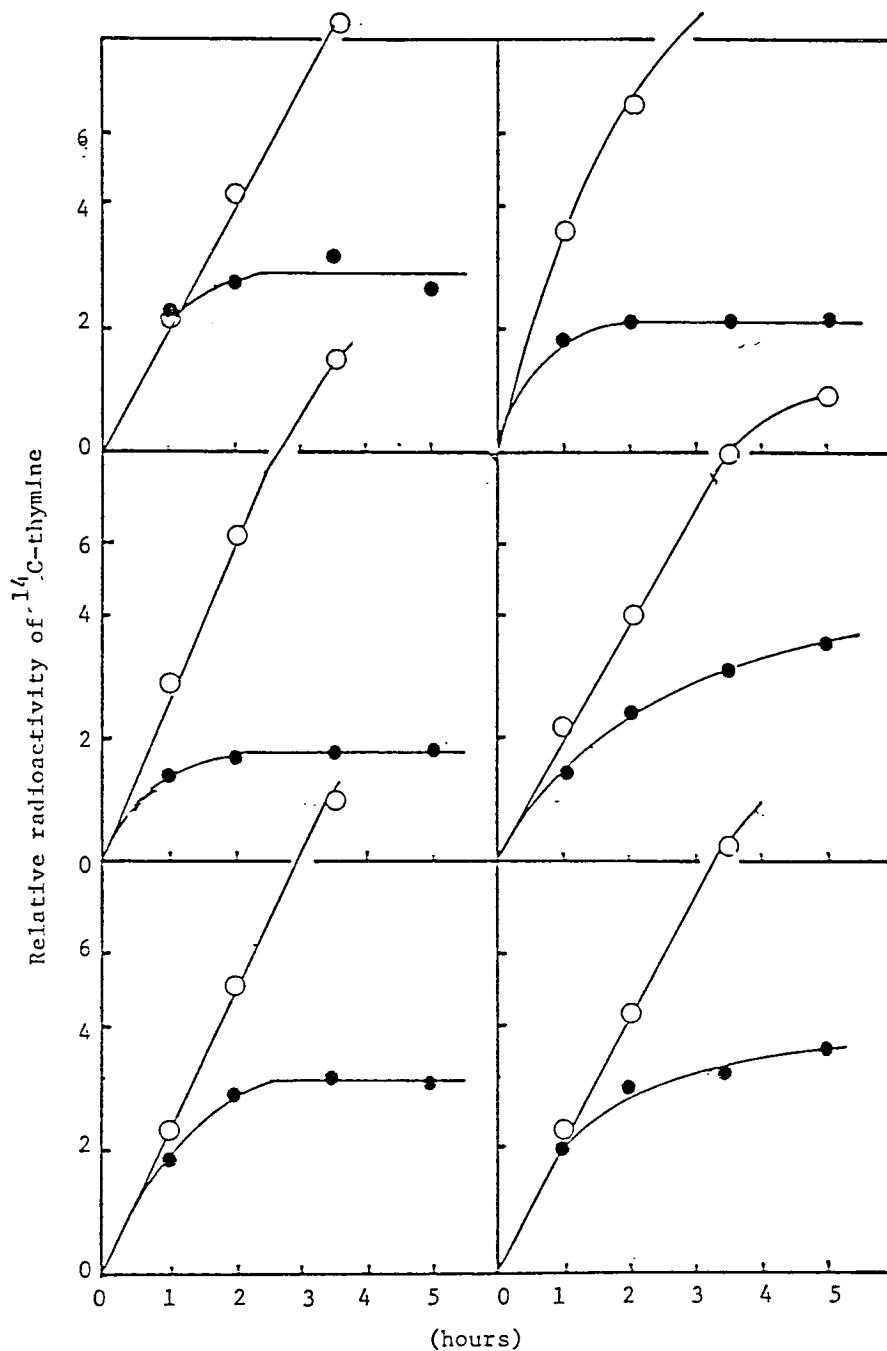


図6 das-198, das-199の示す高温での安定DNA合成

30℃、42℃でそれぞれMEカザミノ酸培地で培養した1晩培養液を¹⁴C-チミン(1.4μCi/ml)を含む同じ培地で20倍希釈したものをそれぞれ2つ用意し、もと同じ温度で培養を続ける。2時間後、片方の培養液に150μg/mlのクロラムフェニコールを加え、そのときを0時間とし以後サンプリングをおこない、¹⁴C-チミンの取り込みを調べた。(●)はクロラムフェニコールを加えたもの、(○)は加えなかったものを示す。A, KH5402-1(dnaA⁺, das⁺, supF6); B, YT221(dnaA17, das-198, supF6); C, YT224(dnaA17, das-199, supF6)

第2節 dnaA遺伝子産物欠失下でのminiFプラスミドの保持

[1] miniFプラスミドによるdnaA変異株の形質転換

前節で分離したrnh-199を用いて、dnaA17,rnh-199,supF6をもつ3重変異株、YT297、を作製した。この株は30°Cで培養する時はアンバーサプレッサーsupF6により、dnaA17,rnh-199両アンバー変異が抑制され、dnaAに依存するoriCからの染色体複製の開始がおこる。一方、42°Cで培養するとsupF6が失活するため、DnaAタンパク質、RNaseHとともに合成されなくなるため、oriCからの複製開始はおこらず、oriKからの複製開始により増殖する(図7)。

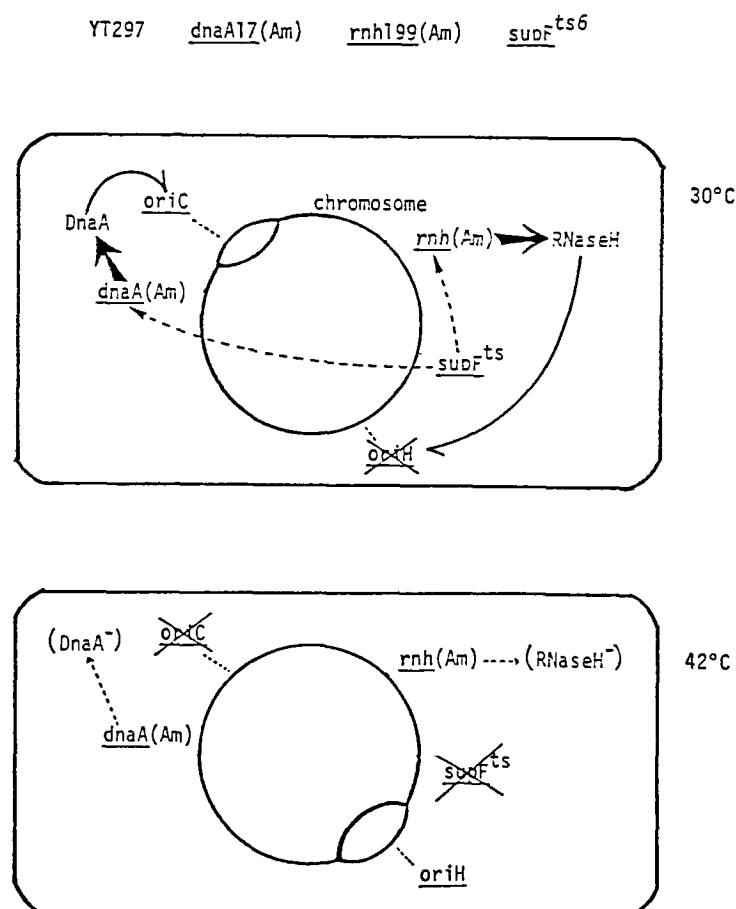


図7 YT297株における染色体複製

このYT297株について解析している際、miniFプラスミドpSC138が42℃でこの株を形質転換できないことを見出した。一方、30℃では正常に形質転換できる（表9）。親株のKH5402-1(*dnaA*⁺, *rnh*⁺, *supF6*), YT378(*dnaA*⁺, *rnh*-199, *supF6*)では42℃でも30℃と同程度に形質転換できた（表9）。このことは42℃という高温条件やRNaseHの欠損が、pSC138がYT297を42℃で形質転換できない理由でないことを示している。おそらく、YT297株では42℃でDnaAタンパク質が欠損しているためにpSC138が形質転換できなかったものと推測できる。

しかし、YT297株では、42℃ではDnaAタンパク質の欠損と同時にRNaseHも欠損しており、この2つのタンパク質が同時に欠損していることが、pSC138が形質転換

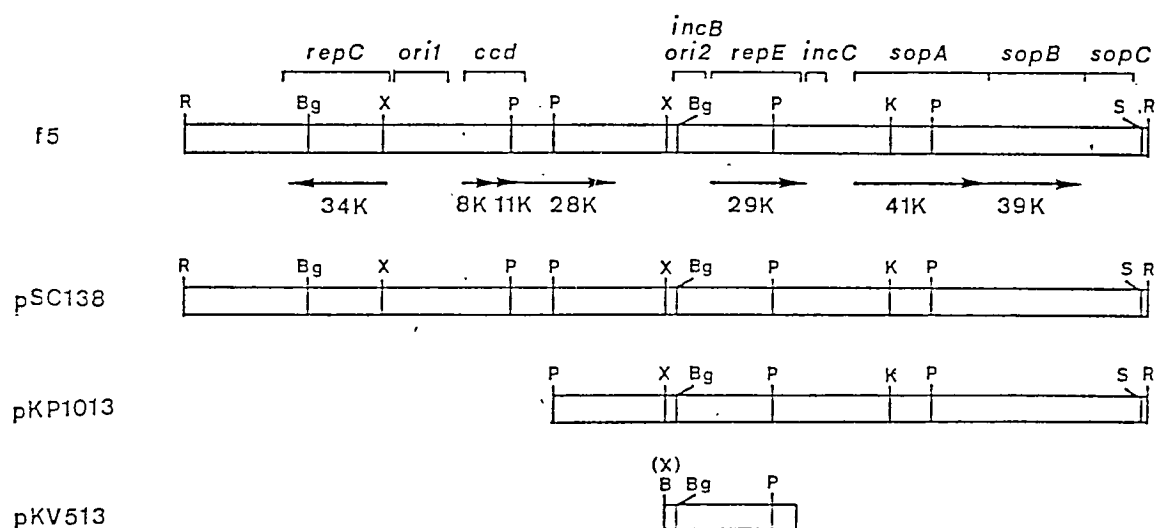


図 8 実験に用いたminiFプラスミドの構造

F因子のf5断片上の遺伝子を示す。矢印はそれぞれの遺伝子がコードするタンパク質を示し、その下の数字は分子量を示す（キロダルトン単位）。図に示したminiF断片の他に、pSC138とpKV513はアンピシリン耐性遺伝子を、pKP1013はクロラムフェニコール耐性の遺伝子を持っている。遺伝子記号はKline(57)に従った。但し、Kline(57)の*oriS*と*oriV*は、それぞれ*ori2*、*ori1*と表した。次の記号は制限酵素による切断部位を示している。R, EcoRI; Bg, BglII; X, XhoI; P, PstI; K, KpnI; S, SalI; B, BamHI; H, HindIII

できない原因であるとも考えられる。そこで、rnh-199によりdnaA17を抑制するかわりに、P2sig5ファージ(68)の溶原化によって抑制する、いわゆるintegrative suppressionをおこなう株を作製した。P2sig5ファージは86.9分のattP2 IIに溶原化している。そこで87.3分付近に挿入しているzih-5::Tn5のカナマイシン耐性を選択マーカーにして、P1形質導入を用いてP2sig5をKY8422(dnaA17,supF6)に導入し、YT341株を得た。表9に示す通り、YT341を用いてもYT297と同様、pSC138は42°Cでこの株を形質転換できない。従って、dnaAが失活し、DnaAタンパク質が欠損していることがpSC138の形質転換不能の原因であると結論できる。また古典的な高温感受性ミスセンス変異である、dnaA5やdnaA46をもつKN1491やYT339株を用いた場合でもYT297と同様の結果が得られており、dnaAの失活によるこのような効果は、dnaA17アンバー変異だけでなく他のdnaA変異でもおこることがわかる。

miniFプラスミドpSC138は、ori1,ori2 2つの複製開始点をもっている(図8)。そこで、ori2のみをもつさらに小さいminiFプラスミドpKP1013,pKV513を用いて、dnaA株への形質転換能について検討した。特にpKV513はプラスミドの自律的複製に必須なori2とrepE(95,123)のみをもつプラスミドであり、プラスミドの分配に必要な領域(57.40)をもたないため、分配機構に関する影響を無視できる。表9に示す通り、pKV513,pKP1013ともにpSC138と本質的に同じ結果を示している。形質転換に用いた受容菌は、30°C,42°CでともにpBR322によって正常に形質転換できることから、プラスミドDNAを細胞内にとりこむ段階には異常がないことがわかる。同時にpBR322の形質転換には、dnaAの機能が必要でないことを示している。対照に用いたpSC101は、その複製にdnaAが必要なことが知られている(49,86,87)。pSC101は、42°CでYT297,YT341のdnaA変異をもつ株を形質転換できない。

Strain	Genotype			Ratio of transformants (42°C/30°C) ^(a)				
	<u>dnaA</u>	<u>rnh</u>	others	pSC138	pKP1013	pKV513	pSC101	pBR322
KH5402-1	+	+	<u>supF6</u>	0.93	0.84	0.84	0.91	0.88
YT378	+	<u>199</u>	<u>supF6</u>	0.63	0.62	0.73	0.71	0.68
YT297	<u>17</u>	<u>199</u>	<u>supF6</u>	<2.0X10 ⁻³	<1.8X10 ⁻³	<5.6X10 ⁻³	<5.1X10 ⁻³	0.64
YT341	<u>17</u>	+	<u>P2sig5</u>	<1.4X10 ⁻³	<1.2X10 ⁻³	<7.8X10 ⁻³	<2.3X10 ⁻³	1.01
KN250	+	+	<u>supD126</u>	0.11	0.42	0.28	0.65	0.84
KN1491	<u>5</u>	<u>199</u>	<u>supD126</u>	<5.9X10 ⁻⁵	<1.9X10 ⁻³	<1.6X10 ⁻⁴	<2.0X10 ⁻³	0.16
YT339	<u>46</u>	<u>199</u>	<u>supD126</u>	<9.1X10 ⁻⁴	<2.9X10 ⁻³	<1.6X10 ⁻⁴	<1.0X10 ⁻³	0.82

表9 miniFプラスミドによる dnaA変異株の形質転換

(a) 形質転換は第2章[11]の(B)法でおこなった。用いたプラスミドは約100ngである。薬剤耐性の発現のために30°Cで1時間保温の後、適当に希釈して薬剤を含む寒天培地2枚にまき30°Cと42°Cで24~36時間培養し形質転換コロニーを数えた。30°Cでの形質転換効率は1μgのプラスミドDNAあたり $1.8 \times 10^3 \sim 5.9 \times 10^5$ であった。

〔 2 〕 DnaAタンパク質欠損条件下でのminiFプラスミドの保持

次に、miniFプラスミドによって30℃で形質転換されたYT297, YT341株を用いてDnaAタンパク質欠損下での宿主の増殖を調べた。表10をみると、miniFもしくはpBR322をYT297, YT341株は非選択LB培地上で、30℃, 42℃どちらの温度でも同程度のコロニー形成能をもつことがわかる。この事実は、miniFプラスミドがこれらの株を42℃で形質転換できなかったのは、DnaAタンパク質欠損条件下でminiFプラスミドによって宿主細胞の増殖阻害がおこったためではないことを示す。

また、プラスミド保持菌を選択するための培地上で、miniFをもつdnaA欠損株をまいたところ30℃では正常にコロニーを形成するが、42℃ではコロニーを形成しない。pBR322をもつ株は42℃でも正常なコロニー形成能を示す。この結果から、dnaAが欠損した状態で宿主菌がminiFプラスミドを保持できないと推測できる。

この推測を確かめるため次の実験を行った。miniFプラスミドpSC138, pKP1013, および対照のプラスミドpSC101をそれぞれもつYT297(dnaA17, rnh-199, supF6)およびYT378(dnaA⁺, rnh-199, supF6)について、非選択液体培地30℃, 42℃で培養した時のプラスミドの脱落について調べた(図9)。YT297では、30℃で培養を続けた場合少なくとも4～5世代に渡ってプラスミドをもたない細胞が出現せず、miniFが安定に保持されることがわかる(図9 B○)。

しかし、培養温度を42℃にすると、温度上昇後ほぼ2世代後からプラスミドをもたない細胞が出現しはじめ、その割合が増加する(図9 B●)。この2世代という時間は、30℃で培養中アンバーサプレッサーのはたらきによって合成されていたDnaAタンパク質が、42℃に温度上昇後アンバーサプレッサーの失活により生産されなくなり、細胞分裂によって希釈されるのに要する時間を示すものと考えている。pKP1013およびpSC101の脱落の割合は、どちらも1世代たつとプラスミド保持菌の割合が半減するという値を示しほぼ同じである。これは両方のプラスミドの脱落が同一の機構でおこっていることを示唆する。

pSC138の脱落の割合は、他の2つのプラスミドよりかなり遅い(図9 A)。これは、pSC138をもつYT297の42℃での生育が他のプラスミドをもつものよりも遅いことを反映していると思われる。pSC138はccd遺伝子をもつがpKP1013はもたない(図8)。ccdをもつプラスミドが細胞から脱落すると、その脱落菌の多くがccdの作用により殺される(49, 86, 87, 101)。その結果、細胞集団全体の生育速度が遅

表 10 miniFプラスミドをもつ dnaA変異株の生育とプラスミドの保持。

Strain	Plasmid	Ratio of colony formers (42°C/30°C) ^(a)	
		LB agar	LB agar with antibiotics
YT297	pSC138	0.82 ^(b)	$<9.0 \times 10^{-9}$
	pKP1013	1.1	$<5.8 \times 10^{-9}$
	pKV513	1.1	2.1×10^{-2} ^(c)
	pBR322	0.98	0.97
YT341	pSC138	0.91 ^(b)	9.2×10^{-9}
	pKP1013	1.2	$<8.4 \times 10^{-9}$
	pKV513	1.0	1.2×10^{-2} ^(c)
	pBR322	1.0	0.96

- (a) YT297, YT341それぞれを表に示したminiFプラスミドもしくはpBR322によって30°Cで形質転換する。得られた形質転換体をプラスミド選択のための薬剤を含むL培地に植え、30°Cで一晩培養する。この一晩培養液を希釈し、薬剤を含むものと含まないL寒天培地にまき、それぞれ30°Cと42°Cで24～36時間保温後出現したコロニー数を数える。
- (b) 42°Cで出現するコロニーが他のプラスミドを持つ菌に比べて小さい。
- (c) 42°Cで出現するコロニーは非常に小さい。このコロニーを再び薬剤入りのL寒天培地に塗布すると、もはやコロニーを形成しない。これは、pKV513はincCをもたないために(図7)、宿主菌細胞内でのコピー数が上昇しており(10～20コピー/細胞)、プラスミドが細胞分裂によって失われるまでに時間がかかるためと思われる。

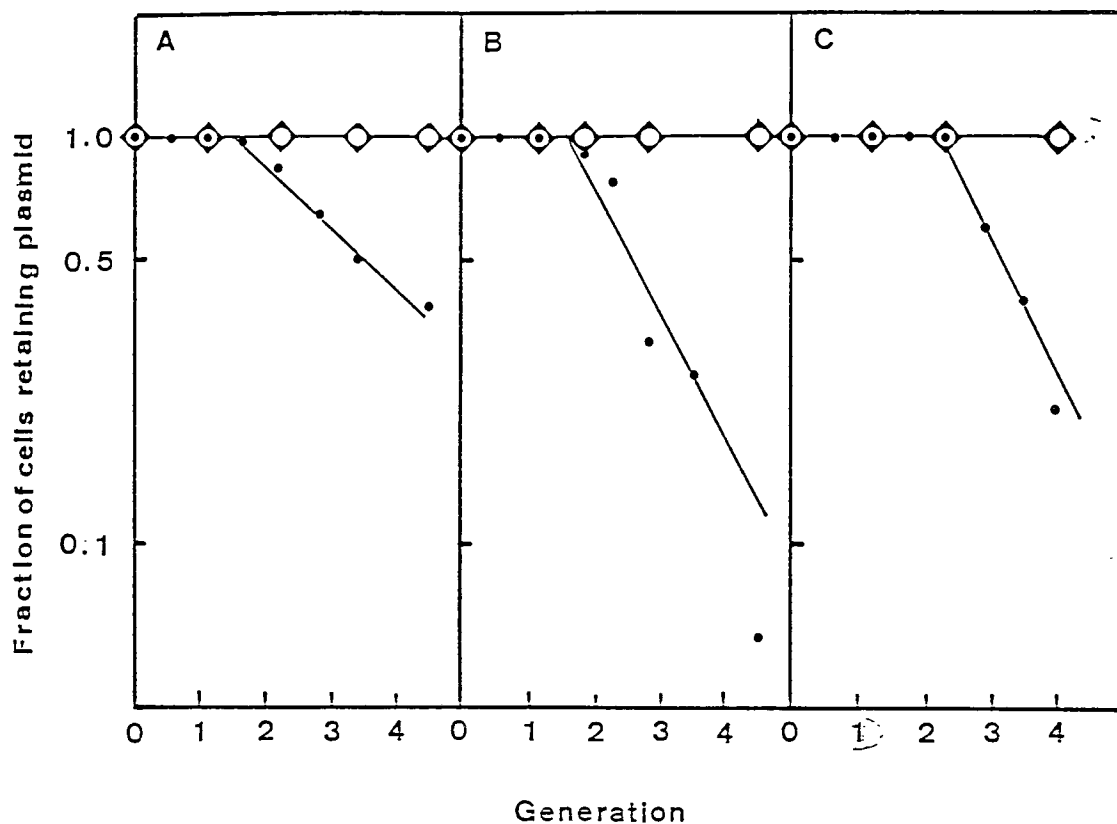


図9 dnaA変異株におけるminiFプラスミドの保持

適当な薬剤を含むL培地で30℃一晚培養したプラスミド保持菌を一回洗浄後、薬剤を含まないL培地で50倍希釈する。30℃で2時間培養後、培養液を2つに分け、1つを42℃に移し、もう一方は30℃で培養を続ける。適当な間隔であらかじめ温めておいた培地で希釈をおこない対数増殖を保つ。サンプルをとり、非選択培地にひろげ、30℃で培養する。出現したコロニーをそれぞれのサンプルについて200個とり、選択寒天培地につまようじで植えて、プラスミドを持つものの割合を調べた。(○) YT297, 30℃; (●) YT297, 42℃; (◆) YT378, 42℃; A, pSC138; B, pKP1013; C, pSC101

くなると思われる。これによって、pSC138の脱落の割合がpKP1013より遅いことが説明できる。また、表10でpSC138をもつYT297, YT341がLB培地上42℃で他のプラスミドをもつものに比べて小さいコロニーを作ること、同じccdの作用で説明できる。一方、pSC101ではccdのような遺伝子は知られていない。

dna⁺の対照であるYT378は、42℃でもminiF, pSC101の脱落はおこらない。またdnaA5, dnaA46をもつ株(KN1491, YT339)を用いた場合も同様の結果が得られる（データは略）。以上の結果から、miniプラスミドはpSC101と同じく、その安定保持のためにはdnaAの機能を必要とすることが明かとなった。特にori2のみをもつpKP1013の結果から、ori2からの複製がDnaAタンパク質の欠損下で阻害されているものと考えている。ori1については、ori1が複製開始点として機能し得るかどうか疑問であり、そのことについては第4節で述べる。

〔3〕dnaA遺伝子産物のori2からの複製への関与

前節までの結果から、ori2からの複製にDnaAタンパク質が必要であることが示された。DnaAタンパク質はDNA上の特定の塩基配列、DnaA box、を認識し結合する(34)。miniFのori2領域の塩基配列(94,95)から、ori2の最小必須領域(95)内に2つ、repEのプロモーターと思われる領域(94)の上流約30bpのところに1つのDnaA boxが存在することがわかる（図10）。DnaAタンパク質がori2からの複製に関与するのであれば、これら3ヶ所のDnaA boxを認識し結合するものと思われる。現在までDnaAタンパク質の機能としては以下の2つがわかってる（第1章参照）。①oriC内のDnaA boxに結合し、oriCからの複製開始反応に直接関与する。②dnaAをはじめとするいくつかのプロモーター内のDnaA boxに結合し、その転写を制御する。以上のことを考え合わせると、ori2からの複製におけるDnaAタンパク質の関与の仕方として2つの可能性が考えられる。1つは、ori2からの複製に必須なタンパク質をコードするrepEのプロモーター領域に結合し、その発現を調節する。もう1つは、ori2内のDnaA boxに結合し、その複製開始反応に直接関与する可能性である。我々はそれぞれのDnaA boxの共通配列との類似性や、pSC101の複製開始点のDnaA boxとの対応（第1章図4）から考えて、後者の可能性が強いと推測した。しかし、念のため前者の可能性を検討するために、RepEタンパク質をDnaAタンパク質の影響を受けないプロモーターを用いて発現させてtransに供給

する状態で、ori2をもつプラスミドの複製に対するDnaAタンパク質の必要性を調べた。

RepEタンパクをtransに供給するプラスミドとしてpZK78を作製した(図11(A))。このプラスミドは、RepEタンパク質の構造遺伝子にtrpLのプロモーター(-80から+20まで)および人工合成したλ croのS.D.配列をつないだもの(これは大阪大学の松原謙一博士らによって作製された)を、pBR322由来のベクターにのせたものである。trpLのプロモーターの塩基配列(6)をみると、DnaA boxに相同性をもつ配列はなく、DnaAタンパク質による影響を受けないと思われる。また、pZK78では

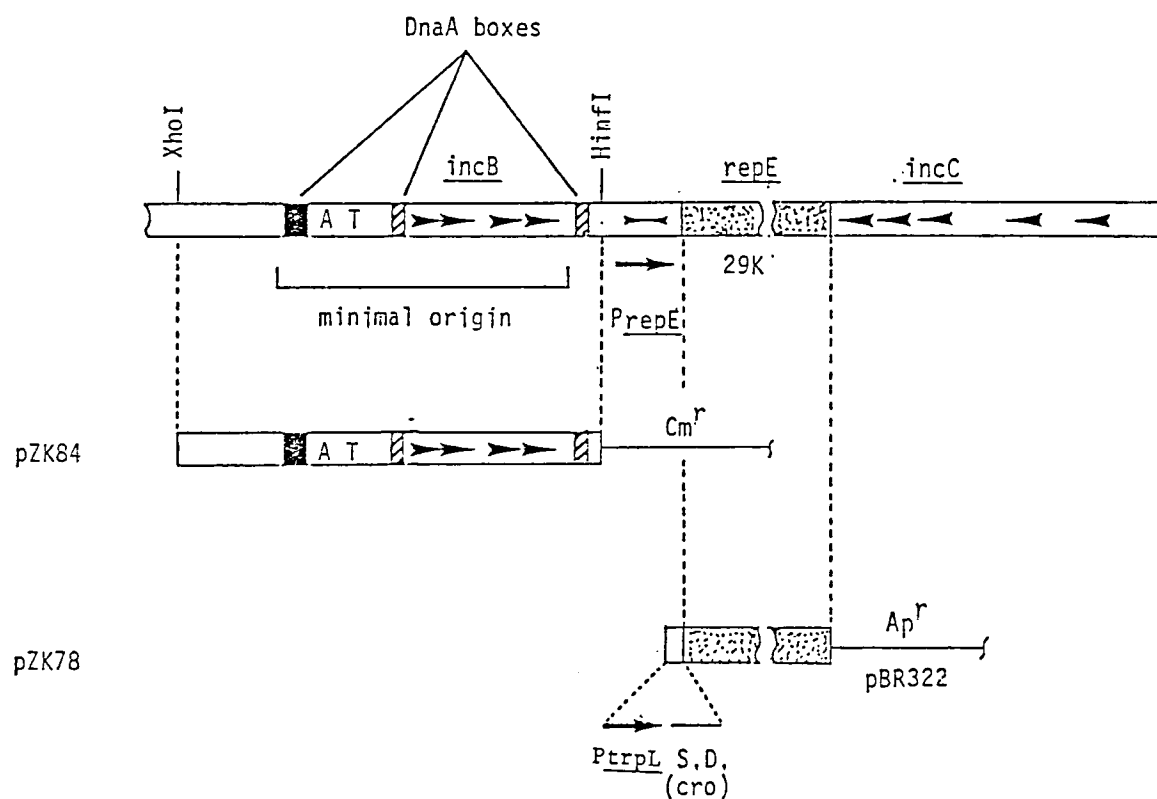


図10 miniF ori2領域、および pZK78, pZK84 の構造を示す

■, ▨ はDnaA boxを示し、■ は共通配列と1塩基異なるものを、▨ は2塩基異なるものを示す。▶ はRepEタンパク質が結合する19bpのdirect repeatをあらわし、◀ はrepEのプロモーターに存在する、inverted repeatを示している。□ はrepEの構造遺伝子。ATはATに富む領域を示している。P_{trpL}, P_{repE}は、それぞれtrpL, repEのプロモーターで、矢印はその転写の向きを表している。S.D.はリボゾームの結合配列を示す。

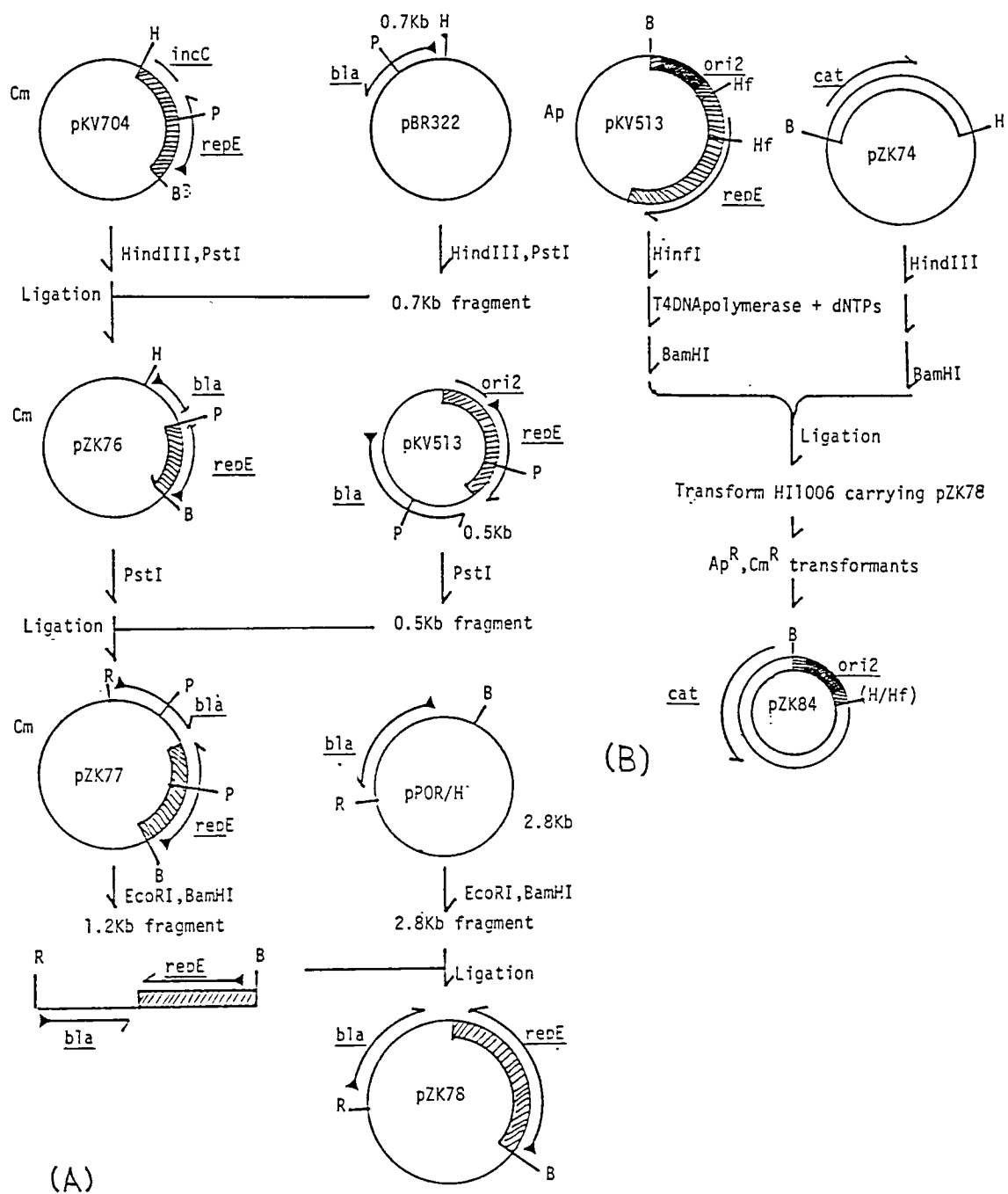


図 11 pZK78 (A), pZK84 (B) の作製
 図中の記号は図 8 と同じ。

repEの下流にある不和合性を示すincC領域も除いてある(図11(A))。一方、ori2のみからなるプラスミドとしてpZK84を作った(図11(B))。このプラスミドはori2の最小必須領域を含む約0.3KbのDNA断片をTn9由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子とつないだものである。pZK84は、このプラスミド単独では自律複製能をもたないが、pZK78が細胞内で共存しRepEタンパク質を供給する場合は複製可能となる。また、pZK84はpZK78と相同なDNA領域をもたないことから、recA⁺株の中でもプラスミド間で組みかえをおこした複合プラスミドを形成することはないと予想される。

pZK78と84をYT341(dnaA17,supF6,P2sig5)およびKH5402-1(dnaA⁺,supF6)内で共存させ、30°C,42°Cでのプラスミドの保持について調べた結果を図12に示す。

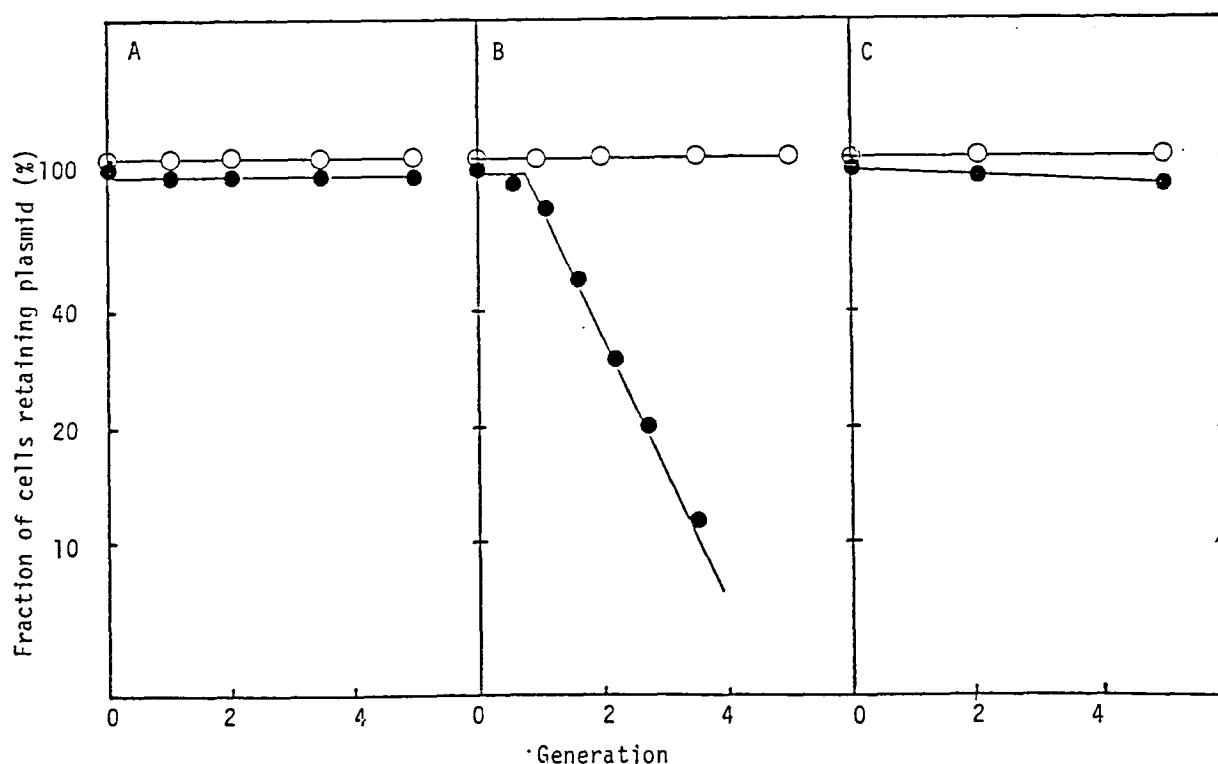


図 1 2 dnaA変異株でのpZK78,pZK84の保持

方法は図5と同じ。但し、プラスミド保持菌を調べるために、非選択培地に形成されたコロニーをアンピシリンを含むものと、クロラムフェニコールを含む寒天培地に同時にうえた。(○),pZK78;(●),pZK84; A,YT341,30°C;

B,pYT341,42°C; C,KH5402-1,42°C

30℃ではpZK78, pZK84ともに安定に保持される（図12A）。このとき2つのプラスミドが複合プラスミドを形成していないことは、調製したプラスミドDNAのアガロース電気泳動のパターンから確かめた。42℃に培養温度をあげると、温度上昇後約1世代後からpZK84のみが、速やかに細胞から失われることがわかる（図12B）。一方、対照のKH5402-1では、42℃でも両プラスミドともに安定に保持されることから、YT341で見られた42℃でのpZK84の脱落は高温で培養したためではなく、このときDnaAタンパク質が欠損しているためと思われる。また、この42℃でのプラスミドの脱落の速度は（図9）で示したpSC101やpKP1013と同じく、1世代でプラスミド保持菌が半数に減少するという割合である。このことはDnaAタンパク質欠損下でこのプラスミドの複製が停止していることを示していると考えた。つまり、pZK84ではRepEタンパク質が供給されていてもDnaAタンパク質が欠損すると複製がおこらないということであり、前に述べたようにDnaAタンパク質がori2からの複製に直接関与することを強く示唆している。

第 3 節 miniF, ori2 における DnaA box の必要性

[1] 欠失変異の導入による解析

前節の結果から、DnaAタンパク質がori2からの複製に直接関与すると考えられる。その場合、DnaAタンパク質は、ori2内のDnaA boxに結合すると予想される。ori2の最小領域内の2ヶ所のDnaA boxのうち、ccd遺伝子側に存在する2つ並んだDnaA boxは、共通配列との類似性も高く、pSC101の複製開始点のDnaA boxとの位置関係もよく似ており（第1章図4）、このDnaA boxにDnaAタンパク質が結合することが、ori2からの複製開始に必要なのではないかと考えた。

これを確かめるため、miniFとpBR322の複合プラスミドであるpZK58（図13）をもとにDnaA boxに欠失変異を導入することをこころみた。欠失変異をもつプラスミドがori2からの複製能をもつ場合、このプラスミドはpolA⁻株、polA⁺株両株で複製できるが、ori2からの複製能を失った場合polA⁻株では複製できなくなる筈である。

実際の欠失変異の導入は、DnaA boxの外側約90bpのところに存在するHindIII切断部位からエキソヌクレアーゼBAL31を用いて、おこなった（図13）。得られた欠失変異をもつプラスミドそれぞれについて、polA⁻株(YT271)に形質転換をおこない、アンピシリン耐性(Ap^R)の形質転換コロニーの数、大きさによって、そのプラスミドのもつori2からの複製能を+，〒，-に分類した。そして、各々の分類に属するプラスミドについて、そのDnaA box付近の塩基配列を決定した。

結果を図14に示す。

del-414のように欠失がDnaA boxに達しないものや、del-409のように欠失が2つならんだDnaA boxのうち最初の1つの中ほどまで達したものでは、その複製能に影響はなく、polA⁻株で、もとのpZK58と同じ程度の数、大きさのAp^R形質転換体コロニーが形成される。しかし、del-439のように最初のDnaA boxを完全に欠失したり、del-438,-418,-413,-433のように2つめのDnaA boxにまで欠失が進むと、ori2の複製能はほとんど失われる（〒）。これらの欠失変異を持つプラスミドはpolA⁻株を形質転換した場合、pZK58とほぼ同数のAp^Rコロニーを形成する。しかし、これらのコロニーはpZK58によるものと比べて非常に小さく、以下に示す理由から

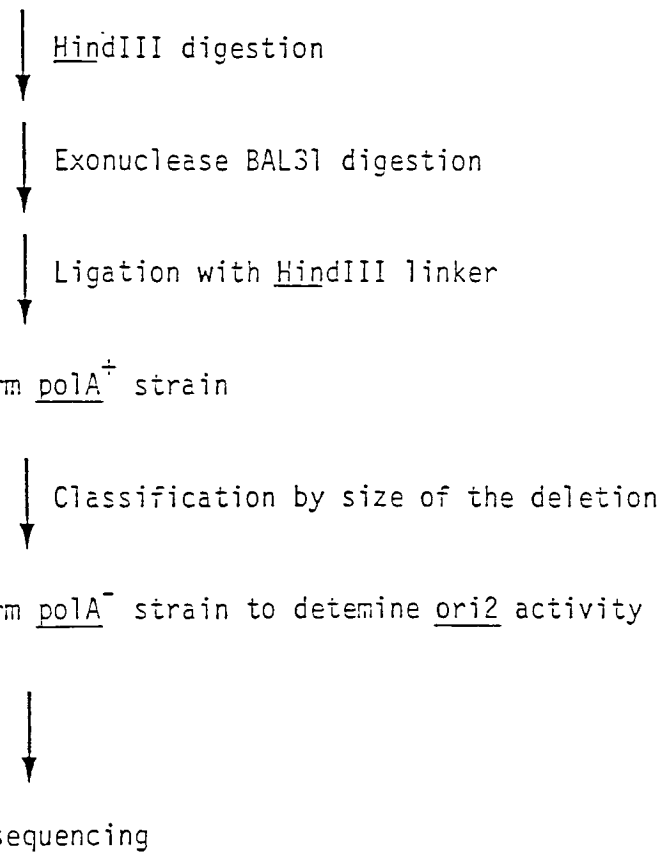
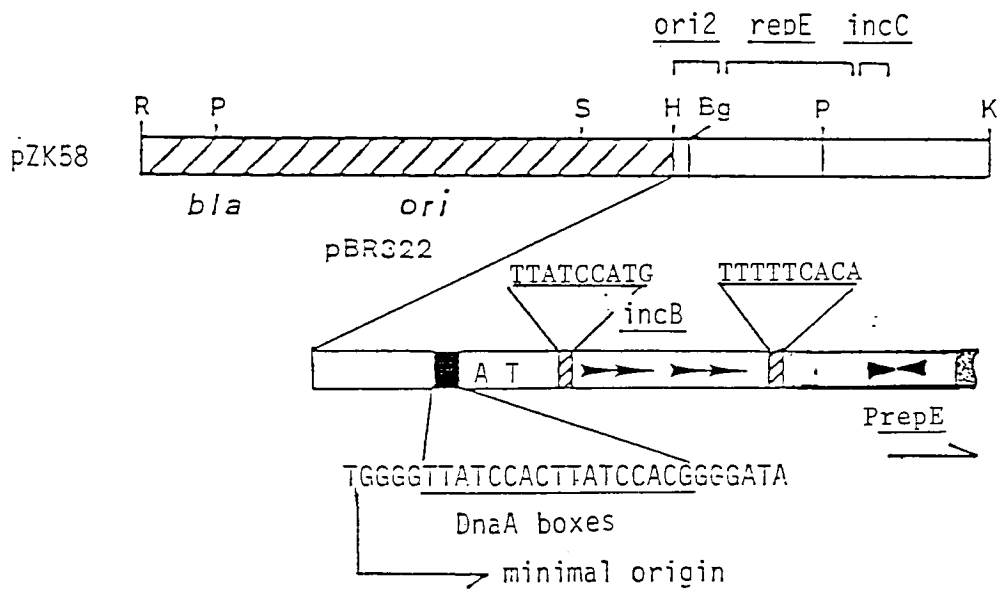


図 13 DnaA box への欠失変異の導入
記号は図 9 と同じ

疑似形質転換体(pseudo transformant)であることが判明した。

これらの小さなAp^Rコロニーを20 μg/mlのアンピシリンを含むL液体培地にうえ、培養すると非常にゆっくりとしか増殖せず、定常状態に達するまで通常の形質転換体のほぼ3倍の時間がかかる。しかも、そうして得た培養液中の生菌のうち、プラスミドを持つ(Ap^Rを示す)菌の割合を調べると、生菌中の0.01~0.03%であった。したがって、これらのプラスミドでは、DnaA boxの大部分が欠失により

				Origin Activity
pZK58	TTGGGG	TTATCCACTTATCCACG	GGGATATTTTT	+
del-414	<u>tgc</u> GGG	TTATCCACTTATCCACG	GGGATATTTTT	+
del-409	cgcaag	<u>cttgc</u> CACTTATCCACG	GGGATATTTTT	+
del-439	<u>ttg</u> cg	<u>aagcttgc</u> TTATCCACG	GGGATATTTTT	+
del-438	gctcca	<u>gcaagcttgc</u> ATCCACG	GGGATATTTTT	+
del-418	atccat	ggt <u>gcaagcttgc</u> CACG	GGGATATTTTT	+
del-413	cgaggc	tctccg <u>gcaagcttgc</u> G	GGGATATTTTT	+
del-433	ggggca	<u>agcttgcgcaagcttgc</u>	GGGATATTTTT	+
del-428	cgcaag	<u>cttgcgcaagcttgcgc</u>	<u>aagcttgc</u> TTT	-
DnaA box consensus		TTAT ^C _A CACA TTAT ^C _A CACA		

図14 DnaA box の欠失変異の塩基配列とその変異を持つプラスミドの複製能

大文字はminiF由来の塩基配列、小文字はpBR322由来の配列を示す。下線部はHindIIIリンカーの配列である。点線で囲った部分が共通配列との比較から推定されるDnaA boxである。

破壊された結果、polA⁻の宿主細胞中での複製が著しく阻害され、培養集団中のプラスミド保持菌の割合が減少したものと思われる。そして、希に存在するプラスミドを持つ細胞が β -ラクタメースを分泌し、アンピシリンを不活化するため、集団全体がゆっくり増殖するものと考えられる。

欠失変異が進んで、del-428のようにATに富む領域(AT領域)にまでおよんだものでは、Ap^Rコロニーはまったくあらわれず現れず、ori2の複製能が完全に失われたかが判る。

〔2〕 塩基置換変異による解析

〔1〕の欠失変異の解析から、2つ並んだDnaA boxのうち少なくとも1つのDnaA boxが完全に存在することがori2からの複製に必須であることがわかった。このDnaA boxをDnaAタンパクが認識して結合するのであれば、この1つ残ったDnaA box内に塩基置換変異を導入することにより、DnaAタンパク質の結合がうまくいかなくなり、ori2の複製能が低下することが予想される。そこで、亜硫酸水素ナトリウムを用いた*in vitro* localized mutagenesisでDnaA box内の塩基置換変異をとることを試みた。

〔1〕で分離した欠失変異を持つプラスミドpZK58del-409とpZK58del-428のminiF由来のori2とrepEを含むHindⅢ-EcoRI断片をpUC18のマルチクローニング部位のHindⅢ-EcoRI部位に挿入したプラスミドpZK81 (del-409をもつ)とpZK83 (del-428をもつ)を作製した。これは、pUC18を用いることで、プラスミドのまま直接変異の塩基配列を決定できるからである(38)。これにより〔1〕のときのようにいちいち変異を持つDNA断片をM13ベクターに再クローニングする必要がある。また、pUC18はpBR322と同じoriをもつため、〔1〕と同様polA⁻株を使ってori2の複製能を検定できる。pZK81をEcoRI、pZK83をHindⅢで切断後混合し、熱変性によって一本鎖にした後、徐冷して再結合をおこなわせる。この時pZK81,pZK83,2つのプラスミドのDNAが再結合するとHindⅢ部位近くのdel-409のDnaA box領域が一本鎖となった環状分子が形成される(図15)。この再結合を行わせた混合液を亜硫酸水素ナトリウムで処理した後、一本鎖部分をT4DNAポリメラーゼで修復し、polA⁺菌に形質転換する。それぞれのAp^R形質転換体からプラスミドDNAを調製し、polA⁻株に形質転換を行い、そのプラスミドのori2の複製能を調べた。62種

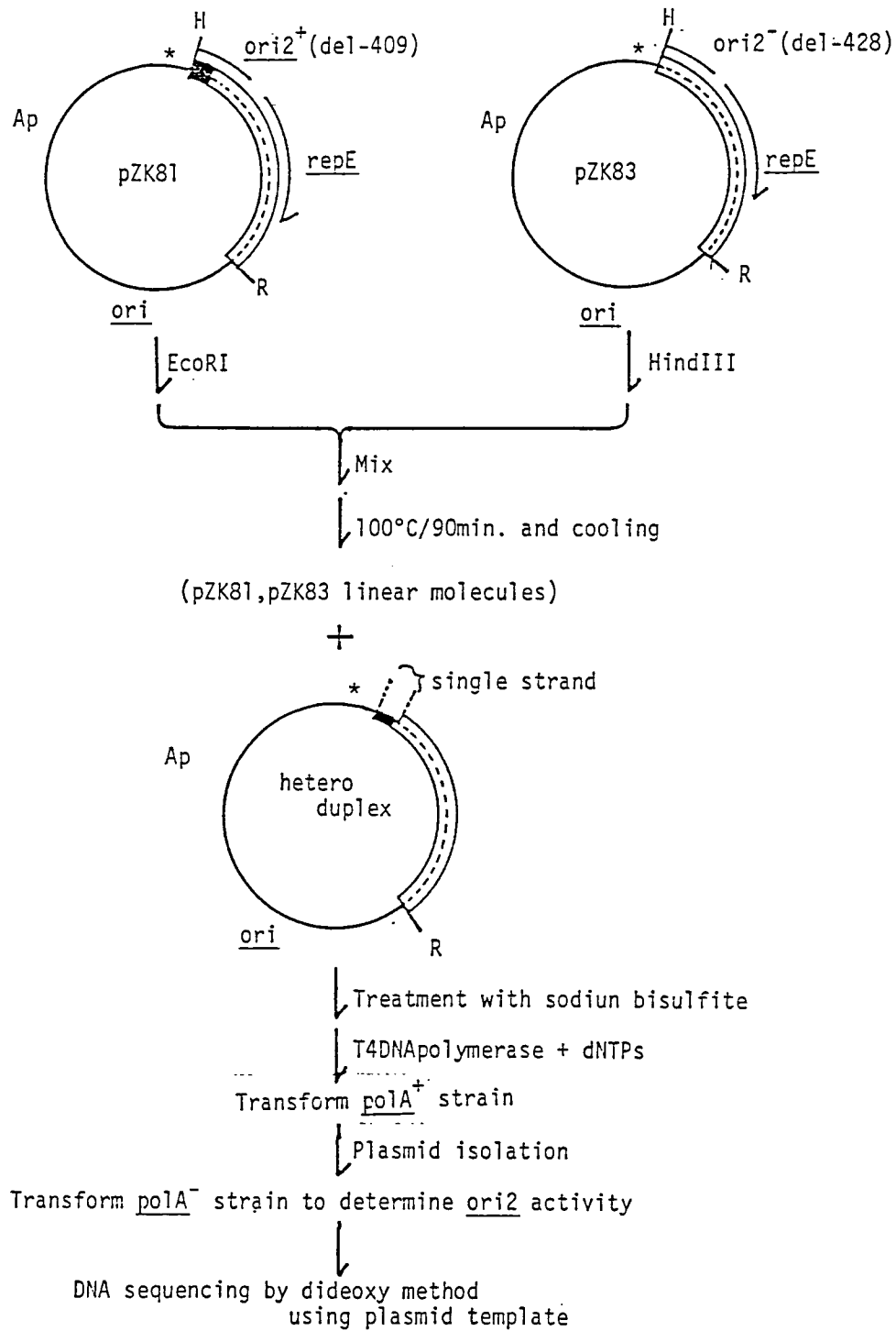


図 15 DnaA box への塩基置換変異の導入

★, 塩基配列の決定のときに用いたプライマーの結合する位置を示す。

DnaA box	Origin Activity
	TTATCCACA	
del-409	<u>ttgc</u> CAC [*] TTATCCACG:GGGATATTTT	+
sub-212	<u>ttgc</u> CAT [*] TTATCCACG:GGGATATTTT	+
sub-250	<u>ttgt</u> CAT [*] TTATCCATG [*] :GGGATATTTT	±
sub-203	<u>ttgc</u> CAT [*] TTATTTACG ^{**} :GGGATATTTT	+

図 1 6 塩基置換変異の塩基配列とその変異を持つプラスミドの複製能記号は図 1 2 と同じ。ただし塩基置換の起こった塩基の上に★をつけている。

のプラスミドを調べたところ、5 個が ori2 の複製能が－であり、1 個が $\bar{+}$ を示し、1 個は \pm で残りは、すべて＋となった。－、 $\bar{+}$ 、 \pm を示すものは全部、＋を示すものは無作為に 4 個を選び、その塩基配列を決定した。その結果 DnaA box 領域に塩基置換変異をもっていたものについて、その塩基配列を複製能と共に図 1 6 に示した。

得られた変異はすべて C → T の塩基置換であり、報告されている (114) 亜硫酸水素ナトリウムによる変異と一致する。

sub-212 では DnaA box のすぐ外側の C が T に変化しているが、この変異による ori2 の複製能への影響はない。sub-250 では sub-212 と同じ変異のほかに、DnaA box の外に 1 ヶ所、DnaA box の中に 1 ヶ所の塩基置換をもつ。この sub-250 は、del-409 と同じ程度の形質転換効率を示すが、そのとき形成される Ap^R のコロニーの大きさが少し小さくなり、ori2 の複製能が低下していることがわかる (\pm)。しかし、[1] の del-418 などの＋のものよりも大きく、液体培地での増殖速度も pZK81 による形質転換体の 2 / 3 程度であり、幾らかの複製能が残っていると思われる。sub-203 では sub-212 と同じ変異のほかに DnaA box 内に 2 ヶ所変異がおこっており、その複製能は $\bar{+}$ で [1] の del-418 などと同程度の複製能を示す。

このように DnaA box 内の塩基置換変異の数が増えるにしたがい、ori2 からの複製能が低下しており、これは、これらの塩基置換変異のために、DnaA タンパク質の DnaA box への認識結合が低下していることを反映しているものと推測できる。

第4節 ori1の複製能

前節まで、miniFプラスミドの2つの複製開始点のうちori2について、DnaAタンパク質の要求性を調べてきた。一方、表9や図9の結果からわかる通り、ori1、ori2、2つの複製開始点をもつminiFであるpSC138もその安定保持にdnaAの機能が必要である。この場合、ori1からの複製にdnaAの機能が必要とも考えられるが、一方で、同じプラスミドにori2が存在する場合ori1は機能しない、という可能性も考えられる。そこでori1について検討をおこなうことにした。そのためには、ori1を唯一の複製開始点としてもつプラスミドが必要となる。しかし、現在までori1のみをもつminiFプラスミドは知られておらず、すべてpBR322等他のレプリコンとの複合プラスミドの形で解析されてきた。

pK032Xは、miniFのEcoRI断片の中のori2領域に約0.3Kbの欠失変異を導入したものを、pBR322系のプラスミドと結合したもので、谷本らにより作製された。この複合プラスミドではDNAポリメラーゼIが失活してもori1が機能するため保持されることが報告されている(120,121)。和田により、このpK032Xからf5断片だけをEcoRIで切り出し、pSC138由来のアンピシリン耐性遺伝子をもつDNA断片と結合して、ori1だけで複製するプラスミドの作製が試みられたが成功しなかった(和田、私信)。

そこで、もう一度pK032Xのori1の複製能を確認するために、第3節でori2の複製能を調べたのと同じく、polA株への形質転換をこころみた。その結果を表11に示す。驚いたことに、pK032Xは対照のpBR322と同様polA1株を全く形質転換できなかった。f5断片をpBR322と結合したpKP1033や自律複製をおこなうori2を含む領域とpBR322を結合したpKP10136(図17、次節)を用いた場合polA株を形質転換でき、用いたpolA株はプラスミドDNAで形質転換され得ることがわかる。これらの結果はpK032Xのori1がプラスミドとしての複製能をもたないことを示していると考えられる。

谷本らをはじめとし、今までori1の解析はpolAの高温感受性変異をもつ株で行われてきた(64,120,121)。そこで我々もpK032Xを用いて高温感受性のpolA変異であるpolA12をもつ株、MM386を形質転換することをこころみた(表12)。すると、pK032XもpBR322もpolA12株を30℃でも形質転換できないことが判った。pKP1033,

pKP10136は30℃,42℃でともにMM386を形質転換できることから、細胞の被形質転

表 1 1 miniFプラスミドとpBR322の複合プラスミドを用いた polA⁺ 株の形質転換

Plasmid	Number of transformans ^(a)		Ratio
	W3110	YT273	
	(<u>polA</u> ⁺)	(<u>polA1</u>)	<u>polA</u> / <u>polA</u> ⁺
pK032X(<u>ori1</u>)	241	0	$< 5.5 \times 10^{-6}$
pKP10136(<u>ori2</u>)	ca.2000	1228	ca.0.61
pKP1033(<u>ori1,ori2</u>)	781	538	0.69
pBR322	1320	0	$< 6.7 \times 10^{-6}$

(a) W3110, YT273両株とも同じ量のDNAを用いて形質転換を行った。W3110でのプラスミド間の形質転換体の数の差は、形質転換に使ったDNAの濃度の差を示している。

表 1 2 miniFプラスミドとpBR322の複合プラスミドによる polA^{ts} 株の形質転換

Plasmid	Efficiency of transformation ^(a)			
	MM386(<u>polA12</u>)		YT240(<u>polA1, supD126</u>)	
	30°C	42°C	30°C	42°C
pK032X	0	0	6.3×10^4	0
pKP10136	5.2×10^4	4.8×10^4	8.4×10^4	5.1×10^4
pKP1033	4.3×10^4	4.1×10^4	6.5×10^4	3.2×10^4
pBR322	0	0	7.2×10^4	0

(a) 形質転換に用いたDNA 1 μ gあたりの形質転換体の数。

換能の問題ではないと思われる。pBR322も30℃で形質転換できないことから、我々の用いたMM386株では、30℃でもpBR322を保持できない程度までDNAポリメラーゼが失活しているものと考えている。事実、MM386(polA12)では30℃においてもそのDNAポリメラーゼ活性が極めて低いことが報告されている(89)。そしてpK032XがpBR322と同じ結果を示すのはori1が複製能をもたないためと思われる。つぎに、polA12のかわりに、polA1がアンバー変異であることから、高温感受性アンバーサプレッサーsupD126(44)とくみあわせた株YT240で同様の実験を行った。supD126によりpolA1が抑制される30℃で形質転換をおこなった場合はどのプラスミドも正常な頻度で形質転換体コロニーが出現する。一方、supD126が失活し、polA⁻となる42℃では、pKP10136, pKP1033などori2をもつものは30℃と同程度の形質転換効率を示すが、ori2がなくori1のみをもつpK032XはpBR322と同様、形質転換体があられない。

以上の結果は、いずれもpK032XがpolAの欠損下ではpBR322と同様の複製能しかもたないことを示しており、pK032Xがもつori1は、少なくともプラスミドとして維持されるのに必要なだけの複製能をもたないと結論できる。

第5節 dnaA欠損下でのminiF・pBR322複合プラスミドによる宿主細胞の増殖阻害

YT297(dnaA17,rnh-199,supF6)を解析する過程で、miniFプラスミドだけでなく、miniFとpBR322の複合プラスミドpKP10136も42℃でYT297を形質転換できないことを見出した(表13)。親株のKH5402-1やYT320では30℃,42℃どちらでも形質転換

表13 miniF-pBR322複合プラスミドによる形質転換

	Host genotype			Plasmid	Transformation ^(a)	
	<u>dnaA</u>	<u>rnh</u>	others		30℃	42℃
YT297	<u>17</u>	<u>199</u>	<u>supF</u> 6(Ts)	pKP10136 (pBR322+ <u>Fori</u> 2)	+	(-)
				pKP1013 (<u>Fori</u> 2)	+	-
				pBR322	+	+
YT320	+	<u>199</u>	<u>supF</u> 6(Ts)	pKP10136	+	+
				pKP1013	+	+
				pBR322	+	+
KH5402	+	+	<u>supF</u> 6(Ts)	pKP10136	+	+
				pKP1013	+	+
				pBR322	+	+
YT341	<u>17</u>	+	<u>supF</u> 6(Ts)	pKP10136	+	(-)
			P2 <u>sig</u> 5	pKP1013	+	-
				pBR322	+	+

(a) 形質転換できた場合を+、できなかった場合を-で示す。(-)は非常に小さいコロニーができることを示す。このコロニーは再び寒天培地に塗布しても、もはや増殖しない。

できることから、この現象もminiFプラスミドの場合と同様DnaAタンパク質の欠損によっておこるもので、高温やRNaseHの欠損によっておこるものではないことがわかる。また、rnh-199のかわりにP2sig5によってdnaA17を抑制したYT341でも、pKP10136は42℃で正常に形質転換できず、このような形質転換ができないことはdnaA,rnhが同時に活性を失ったためではないことがわかる。

このような現象は、DnaAタンパク質欠損下でも形質転換できるpBR322（表13）がminiFプラスミドと結合することによってその形質転換能が失われたことを示している。そこでminiFのどの領域を結合した時にこのような阻害効果がおこるかを調べた（図17）。

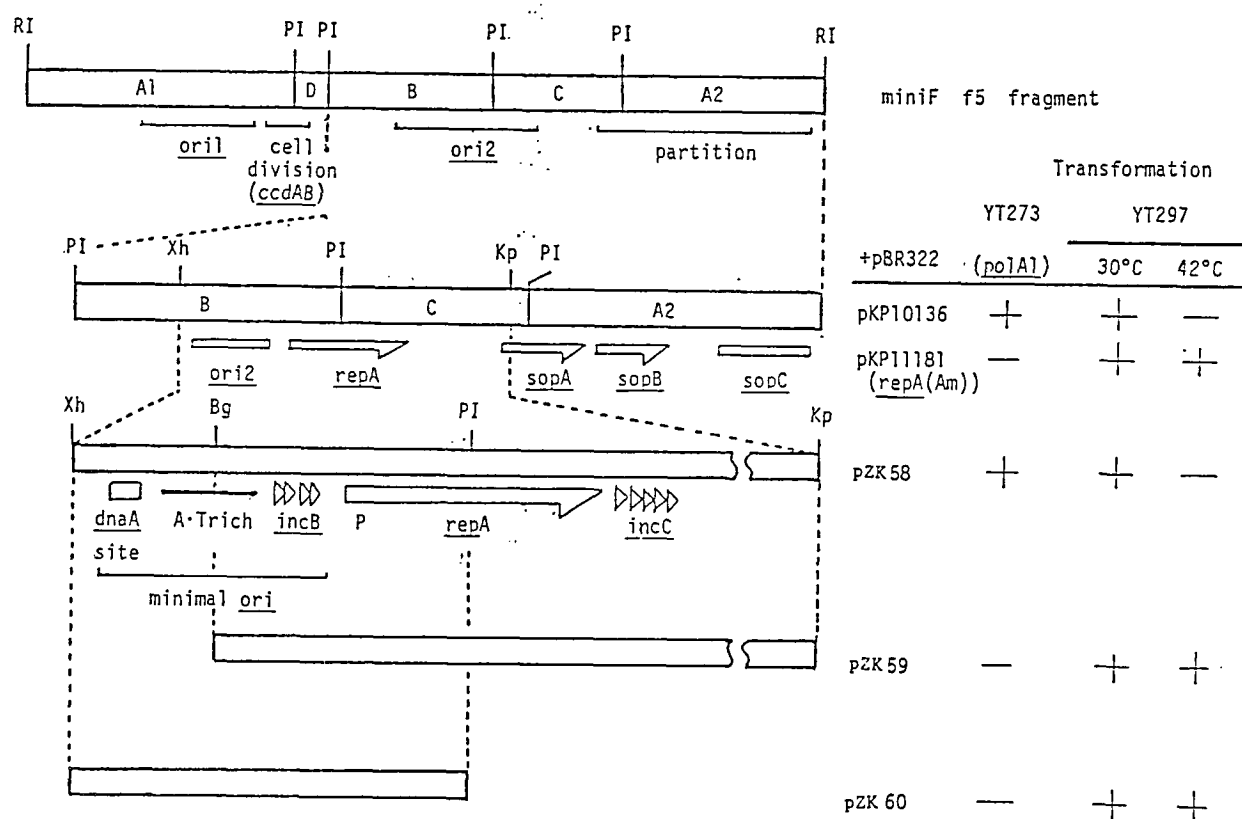


図17 各種miniF-pBR322複合プラスミドによる形質転換

miniF f5断片および各複合プラスミドの持つminiFの領域を示している。矢印はそれぞれの遺伝子の転写の向きを示す。▷はRepEタンパク質の結合するdirect repeatを示している。なお、この図は模式図であり、実際のDNA領域の大きさを示してはいない。

pKP10136は、pBR322のHindⅢ-EcoRI部位にminiFのf5断片のori2,repE,sop領域を含む断片を挿入したものである(図17)。そこで、このori2~sop領域のうちori2とrepEを含むXhoI-KpnI断片をpBR322のEcoRI-HindⅢ部位に挿入した、プラスミドpZK58を作った。このプラスミドもpKP10136と同様42℃でYT297を形質転換できない。このことから、pBR322の形質転換能を失わせているのはこのori2-repEを含む領域であると結した。次にpZK58のminiFの断片のうちori2内のBglⅡ部位からXhoI部位までを欠いたプラスミド、pZK59およびrepE内のPstI部位からKpnI部位までを欠いたプラスミド、pZK60を作製し、YT297への形質転換をおこなった。すると、これら2つのプラスミドはpBR322と同じく、42℃でも30℃と同様に形質転換できた。一方、これらのプラスミドでpolA⁻株(YT271)を形質転換した結果からpZK58はori2からの複製能をもつがpZK59,pZK60はどちらもori2からの複製能を失っていることがわかる。

以上の結果から、pBR322にori2からの自律複製能をもつDNA断片を結合すると、DnaA欠損下でpBR322の形質転換能が失われるものと考えた。そこで、このことをさらに確かめるために、repEのアンバー変異(75)をもつDNA断片をpBR322と結合したプラスミドpKP11181を用いて実験をおこなった(図17)。このプラスミドは42℃でYT297を形質転換できることから、先に述べた推測が確かめられた。

pBR322-miniF複合プラスミドがDnaAタンパク質欠損下で形質転換できない原因を知るために、この複合プラスミドをもつ細胞ではDnaA欠損下での増殖がどうかをしらべた。YT297,YT341を用いて30℃で得た形質転換体について、その30℃と42℃でのコロニー形成能を調べた(表14)。

表14に示す通り両株ともpZK58をもつ場合、42℃でコロニー形成が阻害されている。これはアンピシリンを含まない非選択培地上でもおこることから、pZK58によってDnaAタンパク質欠損下で宿主菌の生育が阻害されており、そのことが42℃で形質転換できなかった原因であると思われる。一方、pZK59,pZK60といった自律複製能をもたないminiFをpBR322につないだものではこのような宿主の生育阻害はおこらない。

表 1 4 miniF-p3R322複合プラスミドをもつdnaA変異株の増殖能

Host	Plasmid	Colony formation Ratio : 42°C / 30°C (a)	
		L + Amp	L
YT297 (<u>dnaA17</u> (Am) <u>rnh-199</u> (Am) <u>supF6</u> (Ts))	pYT58	3.7×10^{-4}	7.8×10^{-4}
	pYT59	1.0	1.1
	pYT60	0.92	1.0
YT341 (<u>dnaA17</u> (Am) <u>supF6</u> (Ts) P2 <u>sig5</u>)	pYT58	7.2×10^{-4}	2.3×10^{-3}
	pYT59	0.9	1.0
	pYT60	0.75	0.9

(a) 表 1 0 と同じ方法を用いている。

第 4 章 考 察

第 1 節 rnh アンバー変異

本研究で dnaA5 の高温感受性を抑制する変異として分離した das-198, das-199 変異は、以下の各性質から RNaseH の構造遺伝子 rnh のアンバー変異と結論した。

- ① rnh 遺伝子の欠損による dnaA 変異の抑制は dnaA に依存しない新たな複製開始点 (oriK, oriH) の活性化によっておこる。したがって、その抑制は dnaA 変異の変異座に対する特異性をもたない(69)。das 変異も、ミスセンス変異である dnaA5 だけでなく、他のミスセンス変異の dnaA46、アンバー変異の dnaA17 を抑制し、dnaA の変異座に対する特異性を示さない。
- ② das-198, -199 変異の大腸菌染色体地図上の位置が rnh 遺伝子の位置と一致する (図 5)
- ③ das-198, -199 の Das 表現型が rnh⁺ をもつプラスミドによって相補される (表 8)。
- ④ rnh の変異株では、タンパク質合成が阻害されても DNA 合成が続く「安定 DNA 合成」表現型を示す。das-198, -199 変異株においても、クロラムフェニコール存在下で DNA 合成が続き、「安定 DNA 合成」がおこる (図 6)。

以上の結果から、das-198, das-199 変異をそれぞれ rnh-198, rnh-199 と名付けた。

しかしながら、既に報告されている rnh 変異では栄養培地感受性の表現型 (Srm⁻ 表現型: sensitive to rich media) を示す(99)が、rnh-198, rnh-199 をもつ株はそのような表現型を示さない (Srm⁺)。しかし、小川等によって分離された rnh-59, rnh-61 変異は最初分離された時は Srm⁺ であり、これは小川等が分離にもちいた親株が Srm⁻ を抑制する変異 (sls⁻) をもっていたためであると考えられている(99)。このことから考えて、我々の分離した rnh-198, -199 が Srm⁺ を示すのは、我々の用いている株が sls⁻ をもっているためと考えられる。

第2節 miniFプラスミドの複製でのDnaAタンパク質の関与

[1] miniFプラスミドの複製におけるDnaAタンパク質の必要性

miniFプラスミドが大腸菌内で自律増殖するレプリコンとして安定に保持されるためには、活性のあるDnaAタンパク質が必要である。dnaAが活性をもつ条件下で、miniFプラスミドは細胞を形質転換でき、その後もプラスミドとして安定に保持される（表9、図9）。一方、dnaAが不活化される条件下では、miniFプラスミドは形質転換できない（表9）。しかもdnaAが活性をもつ条件下で得た形質転換菌は、dnaAが不活化すると細胞分裂につれてプラスミドを脱落する（図9）。したがって形質転換ができなかったのは、形質転換の確立の過程ではなく、その後のプラスミドの保持が阻害されたためと考えられる。このような阻害はdnaA変異をrnhの不活化によって抑制した場合でも、P2sig5の溶原化によって抑制した場合でも観察された。このことは、プラスミド保持の阻害がDnaAタンパク質が欠損したためにおこったことを示している。

それでは、このminiFの保持の阻害はどのような過程でおこるのであろうか。表10に示す通り、miniFプラスミドをもつ細胞はdnaAが活性をもつ状態でも不活化された状態でも同程度のコロニー形成能を示す。このことから、miniFプラスミドが宿主細胞の生育を阻害している可能性が除去できる。また、阻害がプラスミドの娘細胞への分配の過程でおこっている可能性もある。この可能性は完全に除去できないが次の事実からこの可能性は低いと考えている。第1に、pKV513,pZK84といったFプラスミドの分配に関与する領域をもたないものでもDnaAタンパク質が欠損すると安定に保持されない（表10,図12）。第2に、pKP1013をもつ細胞ではDnaA産物の欠損下で、ほぼ1世代でプラスミドをもつ細胞が半減する（図9, B）。

このような脱落速度は、分配機構の阻害によっても説明できないことはないが、プラスミドの複製が停止したために細胞分裂ごとにプラスミドが脱落すると考えるもっとも簡単に説明できる。

pSC101は複製にdnaAの機能を必要とすることが知られている(22,23,24)。我々はpSC101を対照のプラスミドとして用いたが、dnaAの機能の要求性に関して調べた限りでは、miniFプラスミドと同じ結果を示した。以上の結果からminiFプラスミドがdnaA変異株において安定に保持されないのは、DnaAタンパク質の欠損下で

pSC101と同じように複製をおこなうことができないためと考えている。

実験に用いた自律複製能をもつ3つのプラスミドpSC138, pKP1013, pKV513は、どれも同じ挙動を示したが(表9, 10)、これら3つのプラスミドに共通するのはori2からの自律複製に最小限必要な領域である。したがって、ori2からの複製にDnaAタンパク質が必要であると思われる。

ただし、pSC138はori2のほかにori1をもつが、第3章[5]節で示したようにori1が本当に複製開始点として機能しているかどうか疑問であり、ori1からの複製がDnaAタンパク質を必要とするかどうかを議論する以前の問題であろう。

[2] ori2からの複製におけるDnaAタンパク質の関与の仕方

pZK84はori2のみをもつプラスミドでpZK78からRepEタンパク質が供給されると複製をおこない、比較的安定に保持される。このpZK84も自律複製をおこなう他のminiFプラスミドと同様に、活性のあるDNAタンパク質が欠損すると安定に保持されない(図12)。pZK78上のrepE遺伝子はtrpLのプロモーターから転写されるが、そのプロモーター領域にはDnaA boxと相同性をもつ塩基配列はなく、このプロモーターの転写はDnaAタンパク質の影響を受けないと予想される。そうすると図12の結果は、ori2からの複製はRepEタンパク質が供給されていてもDnaAタンパク質が欠損するとおこなわないことを示していることになる。したがってDnaAタンパク質はori2からの複製反応そのものに関与していると考えられる。

一方、miniF本来のプロモーターと予想される塩基配列(94)の上流約30塩基のところにDnaA boxと相同性をもつ塩基配列が存在している(図10)。この配列は、DnaA boxの共通配列と9塩基中2塩基異なっており、それほど相同性が高いとはいえないが、このDnaA boxをDnaAタンパク質が認識結合し、それによってrepE遺伝子の発現を調節している可能性は否定できない。実際に、DnaAタンパク質は自分自身の構造遺伝子やプロモーターのDnaA boxに結することによりその発現を転写レベルで抑制していることが報告されている(3,61,118)。repEの発現に関するdnaAの関与についてはさらにくわしい解析を待たねばならない。

[3] ori2へのDnaAタンパク質の作用

ori2内に2ヶ所存在するDnaA boxのうち、共通配列との相同性が最も高いのは、

ori2の最小領域の端F因子の地図上44.949Kbのところからはじまる2つDnaA boxが並んだ配列である。この2つのDnaA boxはどちらも9塩基の共通配列と8塩基で一致し、2つの配列が一塩基重複する形で存在する(図13)。このDnaA boxに欠失変異を最小領域の外側から導入して解析した結果、2つ並ぶDnaA boxのうち、少なくとも1つが完全に存在することが、ori2からの正常な複製開始にとって必要なことがあきらかになった。(図14)。

dnaA依存性の複製を示すpSC101においても、その複製開始領域内にDnaA boxをもつ(10頁, 図4)。そして共通配列と一致するDnaA box(TTATCCACA)がminiFの上記DnaA boxに対応する位置に1つ存在する。山口等によって、我々と同様の方法でこのDnaA boxに欠失変異を導入することが試みられた。その結果DnaA boxの3bp前まで欠失しても複製能に影響はないが、DnaA boxのうち4塩基まで欠失したものでは完全にその複製能が失われることがあきらかとなった(山口, 私信)。これらの欠失変異をもつプラスミドを分与して頂き、我々もそのことを確かめている(データは略)。このことからori2からの複製には、活性をもつDnaAタンパク質がこのDnaA boxに結合が必要であると考えられる。

さらに塩基置換変異を1つ残ったDnaA box内に導入すると、DnaA box内の変異の数がふえるにしたがいその複製能も減少する。このような結果は、DnaAタンパク質がこの変異をもつDnaA boxと結合する程度が低下し、そのことが複製能の低下として現れていると考えるとうまく説明できる。

しかし、図16に示したsub-250, sub-203はDnaA boxの外側にも変異をもっている。このうちDnaA boxのすぐ外側の変異はsub-212と共通で複製能に影響をおよぼさないと思われるが、それ以外のもう1つの変異が複製能の低下に関与している可能性は否定できない。欠失変異の解析からもdel-439のように(図14)、1つのDnaA boxを完全にもつものでもその複製能が失われていることから、del-409で1つ残ったDnaA boxのすぐ外側の配列が複製においてなんらかの機能を果しているのかもしれない。これがDnaAタンパク質のDnaA boxへの結合に関与するのか、それとも他の過程で必要なのかについては、さらに解析する必要がある。

del-433のように2つのDnaA boxだけをほぼ完全に欠いたものでもpolA⁻株に形質転換すると小さなAp^rのコロニーを作る。欠失がAT領域までですすんだdel-428ではこのようなコロニーが形成されないことから考えて、このDnaA boxを欠いた

ものでもごくわずかの複製能が残っていることを示しているのかもしれない。このようなごくわずかの複製能がDnaAタンパク質に依存するかどうかについては、はっきりしないが、表9の実験の時、dnaA欠損下で形質転換した時にはdel-433で見られるような小さなコロニーは全く形成されないことから考えて、del-433の示すごくわずかの複製能はDnaAタンパク質に依存している可能性が強い。ori2の最小領域内には、もう1つのDnaA boxがある。このDnaA boxはA T領域と19bpの、direct repeatの間に存在し、DnaA boxの共通配列とは9塩基中2塩基異なる(図13)。del-433では、このDnaA boxにDnaAタンパク質が結合するために弱い複製能を示すのかも知れない。このDnaA boxの塩基配列(TTATCCATG)は、sub-250のDnaA boxの配列と同じであり、sub-250が中程度の複製能を示すことから考えて、この配列もDnaAタンパク質が効率は悪いが結合できるとも考えられる。

以上の解析から、miniFプラスミドが宿主内で安定に保持されるためにはdnaAの機能が必須であり、それはDnaAタンパク質がori2内のDnaA boxに結合することがori2の複製開始にとって必要であるためであると考えている。

[4] Fによるintegrative suppression

本研究において、miniFプラスミドの複製にdnaAの機能が必要であることを明らかにしてきた。それでは今までminiFプラスミドの複製がdnaAに依存しないと考えられる根拠になったFによるdnaA変異のintegrative suppressionの現象はどのように解釈すればよいのであろうか。最近P1プラスミドについてもFと同様、その複製にdnaAの機能が必要なことが示され(36)、Fと同様の矛盾が生じている。

HansenとYarmolinsky(36)および、ごく最近miniFの複製にdnaAが必要であることを報告したKline(58)は、以前におこなわれたintegrative suppressionの実験は高温感受性のミスセンス変異のdnaA変異(例えばdnaA46,dnaA5)を用いていたが、それらの変異では高温でも弱い残存活性があり、その活性が挿入されたレブリコンの複製をおこなわせている可能性を示唆した。この可能性を支持する事実として、彼らは欠失またはトランスポゾンの挿入により完全にdnaAが失活した条件でminiP1やminiFが安定に保持されないことを示した。しかし、本研究において我々はdnaA46,dnaA5変異株でもdnaAのアンバー変異株と同様にminiFプラスミドが

保持されないことを示した。つまり、これらのミスセンス変異でも非許容条件下でdnaAがminiFプラスミドを保持できない程度にまで失活していることがわかる。また、以前にTresguerres等によってF'がdnaA46変異株において40℃では自律増殖できるが、42℃ではできないことが示されている(127)。

したがってFによるintegrative suppressionをおこす機構としては次のようなものが考えられよう。本研究で示した通り、ori2からの複製にはdnaAの機能が必須である。しかし、今までに報告されたFによるintegrative suppressionは、すべてF因子全体を使っている。F因子にはori2とは異なる複製開始点が存在する(7,57)ことから考えて、宿主染色体にF因子が挿入している状態ではこれらの複製開始点がもちいられているという可能性がある。P1プラスミドの場合、このことがすでに示されている(36)。しかしFの場合、Kline等(58)によってF因子のintegrative suppressionによってdnaA5を抑制している株でdnaA5をdnaA::Tn10と置き換えることができないことが示された。もし、これがdnaAの完全な失活それ自体の結果であったとするならば、integrative suppressionを行っている条件下の複製開始点は、プラスミドとして保持されている時程ではないが、やはりdnaAを要求していることになる。

現在まで、ori2で複製をおこなっているminiFプラスミドが、F因子と同程度にdnaA変異をintegrative suppressionできるかどうかについては知られていない。もし、integrative suppressionしている状態においてもプラスミド状態の場合と同じdnaAを必要とする複製開始点を使っているのであれば、挿入された状態では何らかの理由によってdnaAの要求性が低下し、dnaA変異の残存活性により複製開始ができるようになったのかもしれない。これに対して、miniR1はdnaAが完全に失活したものでも、integrative suppressionできることが示された(103)。それにもかかわらず、最近miniR1はin vitroの複製系でDnaAタンパク質に依存することが報告された(103)。そしてその複製開始点にはDnaA boxが存在する(107a)。

いずれにせよ、integrative suppressionがおこるためには、挿入するレプリコンや宿主の染色体のどちらかもしくは両方になんらかの突然変異がおこることが必要なのかも知れない。これらの点に関しては今後の解析が必要である。

第3節 miniFのもつ ori1の複製能

miniFの複製開始点のori1は、miniFプラスミドの複製中間体の電子顕微鏡による観察からその場所がF因子地図上42.6Kbときめられた(26)。その後ori1の解析から、ori1の複製開始にはの各遺伝子産物ccdBのすぐ下流の分子量28Kdのタンパク質(Dタンパク質)が必要であるといわれてきた(64,120,121)。しかし、これらの解析はすべてori1と他のプラスミド、多くはColE1系のプラスミド、との複合プラスミドを使っておこなわれた。その複製能を調べる場合、polA^{ts}株である、polA12(120,121),polA214(64)を用いて30℃から42℃に培養温度を上昇した後のプラスミド保持菌の頻度によってしらべられている。

本研究で用いたpK032Xは、谷本ら(120)がpolA欠損条件下でori1が複製能を示すプラスミドとして報告されたものである。このプラスミドはf5断片のori2領域の欠失をもっている。この欠失は、F因子地図上44.8KbのXhoI部位からBAL31によって欠失を導入されたもので、ori2内のBglII部位が消失している。このBglII部位は、AT領域内に存在し、本研究でもこの領域内まで欠失が進んだ場合ori2は全く複製能を失う(図14, del1428)ことがわかっている。またpK032Xでは、RepEタンパク質は合成されていることも示されている。谷本らはこのプラスミドでpolA12をもつ株を30℃で形質転換した後、その形質転換体がコントロールのプラスミドをもつものにくらべて42℃でのプラスミドの脱落の頻度が小さくなることから、ori1が機能していると結論した(86)。

しかし、第3章第4節で示したように、pK032Xは、polAが失活しColE1の複製ができない状態では形質転換ができない(表11,12)。これは、pK032XのもつminiF断片が複製開始能をもたないことを示していると考えられる。谷本らはpolA12変異をもつ株(N1126)には、我々と同様pBR322は形質転換できないがpK032Xは形質転換できると報告しているが、我々の用いたpolA12株(MM386)では形質転換体を得られなかった。これは用いた菌株の遺伝的背景の違いによるものではないかと考えている。少なくとも、MM386ではDNAポリメラーゼ活性が極めて低いことが報告されている(89)。

pK032Xは、ccdやsopなどのプラスミドの安定保持に関与する遺伝子群をもっている。したがって、polA^{ts}変異株を用いて42℃での脱落の程度から複製能を測定

した場合、polA^{ts}の残存活性によってColE1の複製開始がごくわずかに起こればccdやsop遺伝子群の作用によりプラスミドの脱落が起きにくくなり、みかけ上複製が起こっているようにみえた可能性がある。最近orilからの複製に必要なのはccdB下流にコードされる28Kdのタンパク質ではなくccdBがコードするタンパク質であるという報告(65)があるが、これが上述の可能性、つまり今までの解析はorilの複製能をみていたのではなく、プラスミドのccd機構をはじめとする安定保持機構をみていたという可能性を支持しているように思われる。そのように考えると、今までの解析結果はorilの領域が複製能ではなく、何らかの形でプラスミドの安定保持に関与していること示唆していることになり、oril領域がrecA非依存性の組みかえのホットスポットである(53,77,98)という知見となにらかの関連をもつ可能性が考えられよう。

Eichenlaub(26)の電子顕微鏡の観察によって、oril領域でみられた複製中間体は彼らが複製中間体を蓄積させるために用いたチミン飢餓処理によって生じた人為的産物をみたものかもしれない。または、orilはチミン飢餓のような特定の条件下で活性化される、例えば大腸菌染色体のoriKのような領域であるという想像も成り立つ。すべては今後の研究によって解明されるべき課題である。

第4節 pBR322-miniF複合プラスミドによる宿主の増殖阻害

第3章第5節で示した通り、DnaA遺伝子産物欠損下でpBR322-miniFの複合プラスミドによって宿主細胞の増殖が阻害されることが明らかになった。これは自律複製をおこない得るori2を含む断片をpBR322と結合した時におこる(図17)。この増殖阻害がどのような原因でおこるかは不明だが、なんらかの形でori2の複製と関連していることが考えられる。そこで1つの説明として次のような可能性が考えられるだろう。

DnaAタンパク質が欠損した状態ではori2からの複製はおこり得ないが、RepEタンパク質が存在するとこれがori2に結合し(123)、ある種の構造を作ると考えられる。このような構造体が存在すると、宿主のoriKやP2sig5からの複製に必要な因子と相互作用して複合体を形成する。この結果、RepE-ori2の構造体がpBR322程度の高いコピー数で存在すると宿主との間で複製に必要な因子を奪い合い、宿主の複製が阻害される。

このようなプラスミドと宿主の間で複製に必要な因子を奪い合う結果、増殖阻害がおこる例として、片山らが示したものがある(51)。これは、dnaP変異株で見つかったdnaGの変異dnaG2903(93)をもつ株でみられるものである。活性が低下したプライメースを作ると考えられるこの変異株は、RNAポリメラーゼの変異(sdg変異)によってプライメースの発現量が増加すると、その高温感受性が抑制される。このとき、細胞内にpBR322が存在すると宿主の増殖阻害がおこるが、その阻害の程度とsdg変異がプライメースの発現を増加させる程度とよく一致しており、pBR322と宿主染色体の間でプライメースの奪い合いがおこったためと考えられる。

このような例から考えて、miniFとpBR322の複合プラスミドと宿主染色体の間で何らかの複製に必要な因子の奪い合いが起こっている可能性も十分考え得ると思う。この可能性がもし本当ならば、その因子は宿主やF因子の複製にとって重要な因子であると思われるので、この現象の解析によって複製開始を考える上で有用な知見が得られるかもしれない。

文 献

- 1 Andoh, T., and Ozeki, H. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59, 792
- 2 Asada, K., Sugimoto, K., Oka, A., Takanami, M. and Hirota, Y. (1982) *Nucl. Acid. Res.* 10, 3745
- 3 Atlung, T., Clusen, E. S., and Hansen, F. G. (1985) *Mol. Gen. Gent.* 200, 442
- 4 Backman, B. J. (1983) *Microbiol. Rev.* 47, 180
- 5 Baker, T. A., Sekimizu, K., Fumel, B. E. and Kornberg, A. (1986) *Cell* 45, 53
- 6 Bnnett, G. N., Schwengruber, M. E., Brown, K. D., Squires, C. and Yanofsky, C. (1978) *J. Mol. Biol.* 121, 113
- 7 Bergquist, P. L., Soadi, S. and Moss, W. K. (1986) *Plasmid* 15, 19
- 8 Bird R. E., Louarn, J., Martuscelli, J., and Caro, L. (1972) *J. Mol. Biol.* 70, 549
- 9 Boliver, F., Rodriguez, R. L., Greene, M. C., Betlach, H. L., Heyenecker, H. L. Boyer, H. W., and Falkow, S. (1977) *Gene* 2, 95
- 10 Braun, R. E., and Wright, A. (1986) *Mol. Gen. Gent.* 202, 246
- 11 Byersman, D., Messer, W., and Schlicht, M. (1974) *J. Bacteriol.* 118, 783
- 12 Carl, P. L. (1970) *Mol. Gen. Gent.* 109, 107
- 13 Chandler, M. L., Silver, L., and Caro, L. (1977) *J. Bacteriol.* 131, 421
- 14 Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978) *J. Bacteriol.* 134, 1141
- 15 Chatteraj, D. K., Cordes, K., and Abeles, A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6456
- 16 Chatteraj, D. K., Abeles, A., and Yarmolinsky, M. (1985) *Plasmids in Bacteria* p. 355
- 17 Chesney, R. H., Scott, J. R., and Vapnek, D. (1979) *J. Mol. Biol.* 130, 161
- 18 Churchward, G., Linder, P., and Caro, L. (1983) *Nucl. Acid. Res.* 11, 5645
- 19 Cohen, S. N., and Chang, A. C. Y. (1977) *J. Bacteriol.* 132, 734
- 20 Datta, N., and Barth, P. T. (1976) *J. Bacteriol.* 125, 811
- 21 Davis, .R. W., Botstein, D., and Roth, J. P. (1980) *Advanced bacterial genetics* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

- 22 de Massey, B., Fayet, O., and Kogoma, T. (1984) *J. Mol. Biol.* 178, 227
- 23 Disque-Kochem, C., Seidel, U., Hellsberg, M., and Eichenlaub, R. (1986)
Mol. Gen. Gent. 202, 132
- 24 Dodson, M., Echols, H., Wickner, S., Alfano, C., Mensa-Wilmot, K., Gomes, B.,
Lebowitz, J., Roberts, J. D., and McMacken, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 83, 7638
- 25 Ecols, H., Lu, C., and Burger, P. M. J. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80,
2189
- 26 Eichenlaub, R., Figurski, D., and Helinski, D. R. (1977) *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA 74, 1138
- 27 Eichenlaub, R., Wehlamn, H., and Ebbers, J. (1981) *Molecular Biology,*
Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids, Plenum, N.Y. p. 327
- 28 Felton, J., and Wright, A. (1979) *Mol. Gen. Gent.* 175, 231
- 29 Frame, R., and Bishop, J. O. (1971) *Biochem. J.* 121, 93
- 30 Frey, J., Chandler, M., and Caro, L. (1979) *Mol. Gen. Gent.* 174, 117
- 31 Frey, J., Chandler, M., and Caro, L. (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 171
- 32 Fuller, R. S., Kaguni, J. M., and Kornberg, A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 78, 7370
- 33 Fuller, R. S., and Kornberg, A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5817
- 34 Fuller, R. S., Funnell, B. E., and Kornberg, A. (1984) *Cell* 38, 889
- 34a Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557
- 35 Hansen, E. B., Hansen, F. G., and von Meyenburg, K. (1982) *Nucl. Acid. Res.*
10, 7373
- 36 Hansen, E. B., and Yarmolinsky, M. B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83,
4423
- 37 Hasunuma, K., and Sekiguchi, M. (1977) *Mol. Gen. Gent.* 154, 225
- 38 Hattori, M., and Sakaki, Y. (1986) *Analytical Biochemistry* 152, 232
- 39 Helmstetter, C., Cooper, S., Pierucci, O., and Reuelas, E. (1968) *Cold*
Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 809

- 40 Hiraga,S.,Ogura,T.,Mori,H.,and Tanaka,M.(1985) Plasmids in Bacteria
p.469
- 41 Hirota,Y.,Ryter,A.,and Jacob,F.(1968) Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. 33,677
- 42 Hohlfeld,R.,and Vielmetter,W.(1973) Nature(London) New Biol. 242,
130
- 43 Hooper,I.,and Egan,J.B.(1981) J.Virol. 40,599
- 44 Horiuchi,T.,and Nagata,T.(1973) Mol.Gen.Gent. 123,89
- 45 Horiuchi,T.,Maki,H.,and Sekiguchi,M.(1984) Mol.Gen.Gent. 195,17
- 46 Ikeda,H.,and Tomizawa,J.(1965) J.Mol.Biol. 14,85
- 47 Itoh,T.,and Tomizawa,J.(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77,2450
- 48 Jacob,F.,Brenner,S.,and Cuzin,F.(1963) Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol 28,329
- 49 Jaffe,A.T.,Ogura,T.,and Hiraga,S.(1985) J.Bacteriol. 163,841
- 50 Kaguni,J.M.,and Kornberg,A.(1984) Cell 38,183
- 51 片山勉, 村上洋太, 由良隆, 永田俊夫(1986) 第9回日本分子生物学会年会
- 52 Kellenberg-Gujer,G.,and Podhajska,A.(1978) Mol.Gen.Gent. 162,17
- 53 Kilbane,J.J.,and Mulamy,M.H.(1980) J.Mol.Biol. 175,263
- 54 Kimura,M.,Yura,T.,and Nagata,T.(1980) J.Bact. 144,649
- 55 Kline,B.C.,and Seelke,R.W.(1982) Mol.Gen.Gent. 187,218
- 56 Kline,B.C.,and Trawick,J.(1983) Mol.Gen.Gent. 192,408
- 57 Kline,B.C.(1985) Plasmid 14,1
- 58 Kline,B.C.,Kogoma,T.,Tam,J.E.,and Shields,M.S.(1986) J.Bacteriol.
168,440
- 59 Komai,N.,Nishizawa,T.,Hayakawa,T.,Murotsu,T.,and Matsubara,K.(1982)
Mol.Gen.Gent. 186,193
- 60 Kornberg,A.(1980) DNA Replication, Freeman, San Francisco
- 61 Kucherer,C.,Lothar,E.,Kolling,R.,Schauzu,M.-A.,and Messer,W.(1986)
205,115
- 62 Kung,F.-C.,and Glaser,D.A.(1978) J.Bacteriol. 133,755

- 63 Lane, D., and Gardner, R.C. (1979) *J. Bacteriol.* 139, 141
- 64 Lane, D., Hill, D., Caughey, P., and Gunn, P. (1984) *J. Mol. Biol.* 180, 267
- 65 Lane, K., de Feyter, R., Kennedy, M., Phua, S.-H., and Semon, D. (1986) *Nucl. Acid. Res.* submitted
- 66 Lark, K.G. (1972) *J. Mol. Biol.* 64, 47
- 67 Le Bowitz, J.H., and McMacken, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4738
- 68 Lindahl, G., Hirota, Y., and Jacob, F. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2407
- 69 Lindahl, G., and Lindahl, T. (1984) *Mol. Gen. Gent.* 196, 283
- 70 Lother, H., Kolling, R., Kucherer, C., and Schanzu, M. (1985) *EMBO J.* 4, 555
- 71 Louarn, J.M., and Bird, R.E. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 329
- 72 Lovett, M.A., and Helinski, D.R. (1976) *J. Bacteriol.* 127, 982
- 73 Lycett, G.W., Orr, E., and Pritchard, R.H. (1980) *Mol. Gen. Gent.* 178, 329
- 74 Maki, H., Horiuchi, T., and Skiguchi, M. (1983) *PNAS* 80, 7137
- 75 Maki, S., Kuribayashi, M., Miki, T., and T, Horiuchi. (1983) *Mol. Gen. Gent.* 191, 231
- 76 Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 77 Manis, J.J., and Kline, B.C. (1978) *Plasmid* 1, 492
- 78 正井久雄, 宮島篤, 荒井賢一 (1983) *細胞工学* 2, 1554
- 79 Masai, H., Bord, M.R., and Arai, K.-I. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1256
- 80 Meijer, M., Beck, E., Hansen, F.G., Bergmas, H.E.N., Messer, W., von Meyenburg, K., and Schaller, H.C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 586
- 81 Meselson, M., and Stahl, F.W. (1958) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 671
- 82 Messer, W. (1972) *J. Bacteriol.* 112, 7
- 83 Messing, J. (1983) *Methods Enzymol.* 101, 20
- 84 Miki, T., Hiraga, S., Nagata, T., and Yura, T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 75,5099

- 85 Miki,T.,Kimura,M.,Hiraga,S.,Nagata,T.,and Yura,T.(1979)
J.Bacteriol. 140,817
- 86 Miki,T.,Yoshikawa,K.,and Horiuchi,T..(1984) J.Mol.Biol. 174,605
- 87 Miki,T.,Chang,Z.-T.,and Horiuchi,T.(1984) J.Mol.Biol. 174,627
- 88 Molin,S.,and Nordstrom,K.(1980) J.Bacteriol. 141,111
- 89 Monk,M.,and Kinross,J.(1972) J.Bacteriol. 109,971
- 90 Moody,E.E.M.,and Runge,R.(1972) Genet.Res. 19,181
- 91 Morrison,D.A.(1979) Methods Enzymol. 68,326
- 92 村磯金得. 時野隆至, 室津知明, 松原謙一(1985) 第8回日本分子生物学会
年会
- 93 Murakami,Y.,Nagata,T.,Wada,C.,and Yura,T.(1985) J.Bacteriol. 162,
830
- 94 Murotsu,T.,Matsubara,K.,Sugisaki,H.,and Takanami,M.(1981) Gene 15,
257
- 95 Murotsu,T.,Tsutsui,T.,and Matsubara,K.(1984) Mol.Gen.Gent. 196,373
- 96 Nagata,T.,and Horiuchi,T.(1973) Mol.Gen.Gent. 123,77
- 97 Nishimura,T.,Caro,L.,Berg,C.M.,and Hirota,Y.(1971) J.Mol.Biol. 55,
441
- 98 O'Connor,M.B.,and Malamy,M.H.(1984) J.Mol.Biol. 195,263
- 99 Ogawa,T.,Pickett,G.G.,Kogoma,T.,and Kornberg,A.(1984) Proc.Natl.
Acad.Sci.USA 81,1040
- 100 Ogawa,T.,Baker,T.A.,van der Ende,A.,and Kornberg,A.(1985) Proc.
Natl.Acad.Sci.USA 82,3562
- 101 Ogura,T.,and Hiraga,S.(1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,4784
- 102 Ohmori,H.,Kimura,M.,Nagata,T.,and Sakakibara,Y.(1984) Gene 28,159
- 103 Ortega,S.,Lanka,E.,and Diaz,R.(1986) Nucl.Acid.Res. 14,4865
- 104 Perbal,B.(1984) A pratical guide to molecular cloning, John Wiley
& Sons, N.Y.

- 105 Pritchard, R.H., Barth, P.T., and Collins, J. (1969) Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19, 263
- 106 Ream, L.W., Margossian, L., Clark, A.J., Hansen, F.G., and von Meyenburg, K. (1980) Mol. Gen. Gent. 180, 115
- 107 Rokeach, L.A., Sogard-Andersen, L., and Molin, S. (1985) J. Bacteriol. 164, 1262
- 107a Ryder, T.B., Davison, D.B., Rosen, J.I., Ohtsubo, E., and Ohtsubo, H. (1982) Gene 17, 299
- 108 Saito, H., and Uchida, H. (1978) Mol. Gen. Gent. 164, 1
- 109 Sakakibara, Y., and Yuasa, S. (1982) Mol. Gen. Gent. 186, 87
- 110 榊原祥公 (1986) 第9回日本分子生物学会大会
- 111 Sako, T., and Sakakibara, Y. (1980) Mol. Gen. Gent. 179, 521
- 112 Scheuermann, R.H., and Ecols, H. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7747
- 113 Sharp, P.A., Hsu, M.-T., Ohtsubo, E., and Davidson, N. (1972) J. Mol. Biol. 71, 471
- 114 Shortle, D., and Nathans, D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2170
- 115 Sogard-Andersen, L., Rokeach, L.A., and Molin, S. (1984) EMBO J. 3, 257
- 116 Sompayrac, R., and Maaloe, O. (1973) Nature, New Biol. 241, 133
- 117 Sotomura, M., and Yoshikawa, M. (1975) J. Bacteriol. 122, 623
- 118 Stuitje, A.R., de Wind, N., van des Spec, J.C., Pors, T.H., and Meijer, M. (1986) Nucl. Acid. Res. 14, 2333
- 119 Sugimoto, K., Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M., Nishimura, A., Yasuda, Y., and Hirota, Y. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 575
- 120 Tanimoto, K., and Iino, T. (1984) Mol. Gen. Gent. 196, 59
- 121 Tanimoto, K., and Iino, T. (1985) J. Bacteriol. 147, 736
- 122 Timmis, K., Cabello, F., and Cohen, S.N. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2242
- 123 Tokino, T., Murotsu, T., and Matsubara, K. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4109
- 124 Tolun, A., and Helinski, D.R. (1982) Mol. Gen. Gent. 186, 372

- 125 富沢純一(1970) バクテリオファージの実験, 岩波書店
- 126 Torrey, T.A., Atlung, T., and Kogoma, T. (1984) Mol. Gen. Gent. 196, 350
- 127 Tresguerres, E.F., Nandasani, H.G., and Pritchard, R.H. (1975)
J. Bacteriol. 121, 554
- 128 Tsutsui, H., Fujiyama, A., Murotsu, T., and Matsubara, K. (1983)
J. Bacteriol. 155, 337
- 129 van der Ende, A., Baker, T.A., Ogawa, T., and Kornberg, A. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3594
- 130 Vogel, H.J., and Bonner, D.M. (1956) J. Biol. Chem. 218, 97
- 131 von Meyenburg, K., and Hansen, F.G. (1985) Escherichia coli and
Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology
- 132 Wada, C., and Yura, T. (1974) Genetics 77, 199
- 133 Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953) Nature 171, 737
- 134 Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953) Nature 171, 964
- 135 Watson, L.A., Phua, S.H., Bergquist, P.L., and Lane, H.E.D. (1982) Gene
19, 173
- 136 Yamaguchi, K., and Tomizawa, J. (1980) Mol. Gen. Gent. 178, 525
- 137 Yamaguchi, K., and Yamaguchi, M. (1984) Gene 29, 211
- 138 Yasuda, S., and Hirota, Y. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5458
- 139 Yoshimoto, H., and Yoshikawa, M. (1975) J. Bacteriol. 124, 661
- 140 Zyskind, J.W., Pean, L.T., and Smith, D.W. (1977) J. Bacteriol. 129, 1466

謝 辞

本研究に於て、常に暖かく見守って下さり、励まして下さった由良隆先生、また共同研究者として終始ご援助を賜ると共に、多くの議論をして下さった永田俊夫先生、大森治夫先生に深く感謝いたします。

今井六雄先生、和田千恵子先生、伊藤維昭先生には、実験を進める上で数多くの貴重な助言を頂くと共に、種々の実験材料を分与して頂きました。心からお礼申し上げます。

その他、遺伝部、化学部のスタッフ、院生の皆様にはいろいろご協力頂きました。ありがとうございました。特に、実験の準備などをして頂いた、浅野純子氏、小林真理子氏、吉岡幸代氏、田中喜代子氏、梶本佳宏氏、西川明宏氏、の御援助なしには本研究は進行しませんでした、ここに感謝の意を表します。

堀内嵩先生、三木健良先生、松原謙一先生にはプラスミドを、広田幸敬先生には菌株を快く分与して頂きました、深謝致します。

最後に、本学位論文の作製は、中田恵子女史の存在なしには語れません。そのプロとしての技量に深く敬意を表します。